

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLE LOPES FERREIRA

Banco de sementes e sistemas de propagação *in vitro* como estratégia de conservação para *Bulbophyllum peri* Schltr. e *Epidendrum secundum* Jacq.

CURITIBA

2012

DANIELLE LOPES FERREIRA

Banco de sementes e sistemas de propagação *in vitro* como estratégia de conservação para *Bulbophyllum peri* Schltr. e *Epidendrum secundum* Jacq.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, Área de Concentração em Estrutura e Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana L. F. Ribas
Coorientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt

CURITIBA

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todas as pessoas e instituições que me ajudaram a chegar até aqui e formar a pessoa que sou.

Especialmente à minha família, meu noivo, meus amigos, minha orientadora, meu co-orientador e professores.

Ao Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (PNADB – CAPES) pela concessão de bolsa.

À toda equipe do Orquidário Dr. Frederico Carlos Hoehne, no Jardim Botânico de São Paulo, por liberar a utilização de algumas plantas neste trabalho e auxílio técnico.

Aos parceiros do Projeto Orchid Seed Storage for Sustainable Use (OSSSU) pela ajuda nos momentos de dúvida e apoio para continuar na pesquisa.

**“O covarde nunca tenta,
O fracassado nunca termina e
O vencedor nunca desiste.”**

Norman Vicent Peale

RESUMO

Neste trabalho o objetivo principal foi estabelecer estratégias de conservação *ex situ* para as espécies *Epidendrum secundum* e *Bulbophyllum peri*. Sementes sem armazenamento e armazenadas a -20°C por quatro, oito e doze meses, de ambas as espécies, tiveram suas viabilidades testadas por meio de testes de germinação *in vitro* em quatro meios de cultura (MS, MS/2, WPM e KC). Para *E. secundum* também foram testadas concentrações de BAP (0,55; 1,10 e 2,20 µM) no meio KC e para *B. peri* foi testado pré-resfriamento das sementes sem armazenamento por 21 dias a 8°C. Após subcultivos em meio WPM, as plântulas se desenvolveram e foram aclimatizadas em três substratos: Plantmax florestal® e vermiculita (1:2), sphagnum e fibra de coco (2:1) e carvão e fibra de coco (2:1). O melhor meio de cultura foi o WPM para ambas as espécies. As sementes sem armazenamento de *E. secundum* apresentaram 100% de germinação em meio WPM e à medida que as sementes foram armazenadas houve perda da viabilidade, constatada pela redução da germinação (73,8% após doze meses) e redução dos índices de crescimento e de velocidade de germinação. No melhor meio de cultura (WPM) as sementes sem armazenamento de *B. peri* praticamente não germinaram (7%). Quando submetidas ao pré-resfriamento, a germinação aumentou (40%), porém, a melhor porcentagem de germinação (56,5%) foi encontrada após quatro meses de armazenamento, ocorrendo diminuição da viabilidade após oito e doze meses. Foi constatado que não é necessário adicionar BAP para a germinação de *E. secundum* e que *B. peri* apresenta dormência que pode ser superada pelo tratamento de pré-resfriamento. Na fase de aclimatização o melhor substrato para ambas as espécies foi Plantmax florestal® e vermiculita (1:2), que proporcionou maior porcentagem de sobrevivência para *E. secundum* (100%) e *B. peri* (35%). Para a indução de estruturas semelhantes à protocormos destas espécies, foram utilizadas folhas jovens e mais velhas e protocormos sem o ápice foliar. Os explantes foram inoculados em meio WPM com concentrações de BAP (entre 1 e 40 µM de BAP) e diferentes regimes de luz (escuro ou metade do tempo de cultivo no escuro seguido de fotoperíodo 16 horas). Em ambas as espécies os explantes mais responsivos foram os protocormos sem o ápice, seguidos das folhas mais jovens e folhas mais velhas. Para *B. peri*, após 90 dias de cultivo, as folhas foram pouco responsivas, sendo que os melhores resultados para folhas jovens (6% de explantes com formação de estruturas semelhantes a protocormos (ESPs) e uma média de 5,0 por explante) ocorreram na concentração de 5 µM de BAP e no regime de escuro, seguido de fotoperíodo de 16h e dos protocormos (94% de explantes responsivos e 5,9 ESPs por explante) foi com a concentração de 20 µM de BAP. Para a espécie *E. secundum* após 60 dias os resultados foram melhores, as folhas mais novas formaram 2,0 ESPs por explante e cerca de 70,4% dos explantes foram responsivos na concentração de 1 µM de BAP, em regime de escuro, seguido de fotoperíodo de 16 horas. Para os protocormos a melhor concentração foi de 1 µM de BAP com 100% de explantes responsivos e 4,4 ESPs por explante. A multiplicação *in vitro* foi eficiente a partir de protocormos, com a adição de BAP ao meio de cultura. A análise anatômica demonstrou a regeneração direta dos ESPs a partir de camadas epidérmicas e sub-epidérmicas. Bancos de sementes destas espécies são indicados para a conservação *ex vitro*, porém mais testes devem ser realizados em relação ao tempo de armazenamento superior a doze meses e temperaturas abaixo de -20°C.

Palavras-chave: Orchidaceae; Armazenamento; Multiplicação *in vitro*; Micropropagação.

ABSTRACT

In this work the main objective was to establish ex situ conservation strategies for the species *Epidendrum secundum* and *Bulbophyllum peri*. Fresh and stored seeds at -20 °C for four, eight and twelve months had their viability tested by *in vitro* germination tests on four different media (MS, MS / 2, and KC WPM). *E. secundum* were also tested concentrations of BAP (0.55, 1.10 and 2.20 µM) in the KC medium and for *B. Peri* was tested pre-chilling of fresh seeds for 21 days at 8 °C. After subcultures on WPM medium, the plantlets developed and acclimatization was carried out in three substrates: Plantmax florestal® and vermiculite (1:2), coconut fiber and sphagnum (2:1) and charcoal and coconut fiber (2:1). The best culture medium was WPM for both species. The fresh seeds of *E. secundum* showed 100% germination in WPM medium and there was loss of viability of stored seeds, evidenced by the reduction of germination (73.8% after twelve months) and reduced growth rates and velocity germination index. In the best culture medium (WPM) the fresh seeds of *B. peri* virtually did not germinate (7%). When subjected to the pre-chilling, germination increased (40%), however, the best germination percentage (56.5%) was found after four months of storage and from eight to twelve months, decreased viability was observed. It has been found that it is not necessary to add BAP for the germination of *E. secundum* and *B. peri* has dormancy that can be overcome by the treatment of pre-chilling. In the acclimatization phase the best substrate for both species was Plantmax florestal® and vermiculite (1:2), which showed higher percentage of survival for *E. secundum* (100%) and *B. peri* (35%). For the induction of protocorm-like bodies of these species, we used young and older leaves and protocorms with timmed leaf apex. The explants were inoculated in WPM medium with different BAP concentrations (between 1 and 40 µM BAP) and different light regimes (dark or half the time of culture in the dark followed by 16 hours photoperiod). In both species, the explants most responsive explants were protocorm with timed leaf apex, followed by young leaves and older leaves. To *B. peri*, after 90 days of cultivation, the leaves were unresponsive, and the best outcomes for young leaves (6% of explants with formation of PLBs and an average of 5.0 per explant) occurred at a concentration of 5 µM of BAP and in the dark, followed by a 16 h photoperiod. For the protocorms (94% of explants responsive PLBs and 5.9 per explant) the 20 µM concentration of BAP was the best. For *E. secundum* after 60 days the results were better, the younger leaves formed 2.0 per explant PLBs and about 70.4% of the explants were responsive to the concentration of 1 mM of BAP in the dark, followed by 16-hour photoperiod. For protocorms the best concentration was 1 µM of BAP with 100% responsive explants and 4.4 per explant PLBs. *In vitro* multiplication is efficient from protocorms, with the addition of BAP medium, allowing the large scale production of plants. Anatomical analysis showed the direct regeneration of PLBs from epidermal layers. Seed banks of these species are reliable for conservation ex *vitro*, but more tests should be performed in relation to storage time exceeding twelve months and temperatures lower than -20°C.

Key-words: Orchidaceae; Storage; *in vitro* multiplication; Micropropagation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Fig 1 .** GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE *E. SECUNDUM* A PARTIR DE SEMENTES SEM ARMAZENAMENTO: **a.** PROTOCORMO NO MEIO WPM COM PRIMEIRA FOLHA SE FORMANDO; **b.** PROTOCORMO NO MEIO WPM COM SEGUNDA FOLHA SE FORMANDO; **c-f.** PLÂNTULAS ENRAIZADAS COM CERCA DE 60 DIAS CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA; **c.** WPM; **d.** MS/2; **e.** MS; **f.** KC; **g.** PLANTA COM CERCA DE 8 MESES EM MEIO WPM EM FASE DE ACLIMATIZAÇÃO. BARRA: **a, b** = 0,1 mm; **c, d, e, f** = 1 mm; **g** = 1 cm..... 28
- Fig 2 .** PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE *E. secundum* NA ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO EM DIFERENTES SUBSTRATOS..... 29
- Fig 3 .** INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NO CRESCIMENTO DE PLANTAS ACLIMATIZADAS DE *E. secundum*..... 29
- Fig 4 .** GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE *EPIDENDRUM secundum* EM MEIO WPM: **a.** SEMENTE INCHADA (FASE 1) COM REMANESCENTES DO SUSPENSOR; **b.** SEMENTE GERMINADA (FASE 2); **c.** PROTOCORMO COM ÁPICE FOLIAR, FEIXE VASCULAR EVIDENTE E RIZÓIDES (FASE 4); **d.** PLÂNTULA COM PRIMEIRA FOLHA SE DESENVOLVENDO (FASE 5) ENVOLVIDA PELA PRIMEIRA E SEGUNDA CRISTA; **e.** PLÂNTULA COM SEGUNDA FOLHA SE DESENVOLVENDO (FASE 6); **f.** PLÂNTULA ENRAIZADA. **s:** SUSPENSOR; **fv:** FEIXE VASCULAR; **pc:** PRIMEIRA CRISTA; **sc:** SEGUNDA CRISTA; **pf:** PRIMEIRA FOLHA; **sf:** SEGUNDA FOLHA; **r:** RAIZ. BARRA: 1mm..... 31

CAPÍTULO 2

- Fig 1 .** PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE *B. peri* APÓS 90 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO EM DIFERENTES SUBSTRATOS..... 51

CAPÍTULO 3

- Fig 1 .** ESTIMATIVA DE PRODUÇÃO DE NOVAS PLANTAS DE *Bulbophyllum peri* A PARTIR DO PROTOCOLO DE GERMINAÇÃO COM 56,5% DE GERMINAÇÃO EM MEIO WPM E PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO, COM 6% DE EXPLANTES FOLIARES RESPONSIVOS (5,0 ESPs POR EXPLANTE) E 94% DOS EXPLANTES DE PROTOCORMOS RESPONSIVOS (5,9 ESPs POR EXPLANTE)..... 68
- Fig 2 .** ESTIMATIVA DE PRODUÇÃO DE NOVAS PLANTAS DE *Epidendrum secundum* A PARTIR DO PROTOCOLO DE GERMINAÇÃO, COM 100% DE GERMINAÇÃO EM MEIO WPM E PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO, COM 70,4% DE EXPLANTES FOLIARES RESPONSIVOS (2,0 ESPs POR EXPLANTE) E 100% DOS EXPLANTES DE PROTOCORMOS RESPONSIVOS (4,4 ESPs POR EXPLANTE)..... 73

- Fig 3 .** INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) EM FOLHAS E PROTOCORMOS DE *Bulbophyllum peri*: *a* – FOLHA APRESENTANDO UMA MASSA CELULAR NA REGIÃO BASAL EM MEIO WPM COM 5 μ M BAP; *b, c* – PROTOCORMO APRESENTANDO VÁRIOS ESPs COM A PRIMEIRA FOLHA DESENVOLVIDA (*fo*) EM MEIO WPM COM 20 μ M BAP; *d* – DIVISÕES CELULARES DA EPIDERME DA FOLHA; *e* – ESPs COM O ÁPICE FOLIAR (*ap*) SE FORMANDO A PARTIR DE PROTOCORMOS; *f* – ESPs FORMADOS E PARTIR DE FOLHA EM VÁRIOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO. BARRA: *a, b, c* – 1 mm; *d, e, f* – 0,1mm.....

75

- Fig 4 .** INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) EM FOLHAS E PROTOCORMOS DE *Epidendrum secundum*: *a* – ESPs FORMADOS A PARTIR DE PROTOCORMO APÓS 60 DIAS EM MEIO WPM COM BAP, INICIANDO O ENRAIZAMENTO (FLECHA); *b* - ESPs FORMADOS A PARTIR DE PROTOCORMO APÓS 30 DIAS EM MEIO WPM COM BAP; *c* - ESPs FORMADOS A PARTIR DE FOLHA APÓS 60 DIAS EM MEIO WPM COM BAP, INICIANDO O ENRAIZAMENTO (FLECHA); *d* – INDUÇÃO DIRETA DE ESTRUTURA SEMELHANTE À PROTOCORMO (ESP) E BROTAÇÃO (BR) EM PROTOCORMO; *e* – PROTOCORMO COM FORMAÇÃO DE ESP E PONTOS DE PROCÂMBIO (FLECHAS). BARRA: *a* – 1 cm; *b, c* – 1 mm; *d* – 0,2 mm; *e* – 0,1 mm.....

76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 .	GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Epidendrum secundum</i> , SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A -20°C, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	25
Tabela 2 .	GERMINAÇÃO DE SEMENTES SEM ARMAZENAMENTO DE <i>Epidendrum secundum</i> NO MEIO KNUDSON C ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	25
Tabela 3 .	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>E. secundum</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO A -20°C.....	26
Tabela 4 .	ÍNDICE DE CRESCIMENTO DE <i>E. secundum</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E DIAS DE CULTIVO EM SEMENTES SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A -20°C.....	27

CAPÍTULO 2

Tabela 1 .	GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Bulbophyllum peri</i> , SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A -20°C, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	48
Tabela 2 .	ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>B. peri</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO..	48
Tabela 3 .	ÍNDICE DE CRESCIMENTO DE <i>B. peri</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E DIAS DE CULTIVO EM SEMENTES ARMAZENADAS A -20°C.....	49
Tabela 4 .	PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Bulbophyllum peri</i> , SEM ARMAZENAMENTO E MANTIDAS POR 21 DIAS A 8°C, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.....	50

CAPÍTULO 3

Tabela 1 .	EFEITO DO EXPLANTE E FOTOPERÍODO NA OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM <i>Bulbophyllum peri</i> OBTIDAS EM MEIO WPM CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS 90 DIAS.....	65
-------------------	---	----

Tabela 2 .	EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FOLHAS DE TRÊS MESES DE IDADE DE <i>Bulbophyllum peri</i> CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 90 DIAS.....	66
Tabela 3 .	EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FOLHAS DE OITO MESES DE IDADE DE <i>Bulbophyllum peri</i> CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 90 DIAS.....	66
Tabela 4 .	EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM PROTOCORMOS DE TRÊS MESES DE IDADE DE <i>Bulbophyllum peri</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 90 DIAS.....	67
Tabela 5 .	EFEITO DO EXPLANTE E FOTOPERÍODO NA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM <i>Epidendrum secundum</i> , CULTIVADAS EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS 60 DIAS.....	69
Tabela 6 .	EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FOLHAS DE DOIS MESES DE IDADE DE <i>Epidendrum secundum</i> CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 60 DIAS.....	70
Tabela 7 .	EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FOLHAS DE SEIS MESES DE IDADE DE <i>Epidendrum secundum</i> , CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 60 DIAS.....	71
Tabela 8 .	DE BAP E FOTOPERÍODO NA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM PROTOCORMOS DE DOIS MESES DE IDADE DE <i>Epidendrum secundum</i> CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 60 DIAS.....	72

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO 1 - <i>Epidendrum secundum</i>: viabilidade de sementes e germinação <i>in vitro</i>	16
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 POLINIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES.....	21
2.2 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO, DO MEIO DE CULTURA E DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E FORMAÇÃO DE PROTOCORMOS.....	21
2.3 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO.....	23
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
2.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	24
3 RESULTADOS.....	24
3.1 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO, DO MEIO DE CULTURA E DE BAP NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E FORMAÇÃO DE PROTOCORMOS.....	24
3.2 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO.....	28
3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	30
4 DISCUSSÃO.....	32
5 CONCLUSÃO.....	36
6 REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 2 - <i>Bulbophyllum peri</i>: dormência, viabilidade de sementes e germinação <i>in vitro</i>.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
1 INTRODUÇÃO.....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 POLINIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES.....	44
2.2 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO E DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E FORMAÇÃO DE PROTOCORMOS.....	45
2.3 EFEITO DO TRATAMENTO DE PRÉ-RESFRIAMENTO NA GERMINAÇÃO.....	46
2.4 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO.....	46
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
3 RESULTADOS.....	47

3.1 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO, DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E FORMAÇÃO DE PROTOCORMOS.....	47
3.2 EFEITO DO PRÉ-RESFRIAMENTO NA GERMINAÇÃO.....	49
3.3 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO.....	50
4 DISCUSSÃO.....	51
5 CONCLUSÃO.....	55
6 REFERÊNCIAS.....	55

CAPÍTULO 3 - Indução de estruturas semelhantes à protocormos a partir de folhas e protocormos de <i>Bulbophyllum peri</i> e <i>Epidendrum secundum</i>....	58
RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	59
1 INTRODUÇÃO.....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	61
2.2 INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS A PARTIR DE FOLHAS E PROTOCORMOS.....	62
2.2.1 <i>B. peri</i>	62
2.2.2 <i>E. secundum</i>	63
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
2.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	64
3 RESULTADOS.....	64
3.1 INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS A PARTIR DE FOLHAS E PROTOCORMOS.....	64
3.1.1 <i>B. peri</i>	64
3.1.2 <i>E. secundum</i>	69
3.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	73
3.2.1 <i>B. peri</i>	73
3.2.2 <i>E. secundum</i>	74
4 DISCUSSÃO.....	77
5 CONCLUSÃO.....	79
6 REFERÊNCIAS.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
ANEXOS.....	84

1. INTRODUÇÃO GERAL

Extensas áreas de Mata Atlântica foram reduzidas com perda significativa da diversidade biológica, em consequência de cinco séculos de ocupação desordenada (Fonseca 1992). Estima-se que o valor remanescente deste bioma se encontre entre 5 e 15% de sua cobertura original. No entanto, ainda é uma importante área de distribuição de uma série de espécies endêmicas, como o caso das orquídeas (Peixoto et al. 2002).

Orchidaceae é uma das mais diversas famílias botânicas, apresentando de 20.000 a 25.000 espécies, com dispersão cosmopolita (Dressler 1981). No Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 2.500 espécies (Souza e Lorenzi 2005). Consiste geralmente de herbáceas perenes terrestres ou epífitas. Segundo Barros et al. (2010), a Mata Atlântica conta com 175 gêneros e 1431 espécies de Orchidaceae, sendo que no Paraná ocorrem 128 gêneros e 593 espécies.

Epidendrum secundum Jacq. e *Bulbophyllum perii* Schltr estão entre as espécies de orquídeas que ocorrem no estado do Paraná, com as quais vem sendo realizados estudos, em sua maioria, sobre aspectos taxonômicos e ecológicos (Smidt et al. 2011; Stancik 2009; Pansarim e Amaral 2008). Estas espécies não são restritas ao estado do Paraná, mas na região ocorrem em áreas de Mata Atlântica que vêm sofrendo grande degradação. Esse é um problema mundial, por isso a Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção – CITES incluiu toda a família Orchidaceae na lista, demandando forte controle e monitoramento em relação às orquídeas. Por tudo isso, as espécies *B. peri* e *E. secundum* são de interesse para determinação de protocolos de micropropagação e estratégias de conservação *ex situ*.

Desde que as orquídeas se tornaram desejadas, do ponto de vista horticultural, colecionadores têm extraído plantas de seus ambientes naturais em grande número. Algumas das plantas coletadas desta maneira sobrevivem, no entanto, a grande maioria não resiste por muito tempo. O resultado dessa destruição em massa é o que levou várias espécies a um alto risco ou à extinção (ARDITII, 1992).

Devido à contínua destruição dos habitats naturais, comércio ilegal e ação de colecionadores de orquídeas, muitas espécies estão desaparecendo em uma taxa

alarmante (Hossain 2008). A extinção eminente de várias espécies não depende somente da crescente exploração, mas também se deve a uma lenta multiplicação por vias naturais de propagação (Junghans e Souza 2009). Além disso, há dificuldade das sementes destas plantas germinarem, pois geralmente não possuem reservas nutritivas, requerem uma associação simbiótica com micorrizas e apresentam crescimento lento (Dressler 1981).

Devido ao crescimento lento, a propagação vegetativa não promove um crescimento populacional rápido. Por esta razão, a micropropagação tem sido extensamente utilizada com esta finalidade (Sopalun, 2010). Desde que Knudson, em 1922, desenvolveu um método para a germinação assimbiótica de sementes de orquídea, essa técnica passou a ser habitualmente utilizada para a propagação em larga escala de várias espécies (Hossain, 2008).

Para a conservação de orquídeas, são necessárias estratégias à longo prazo (Machado Neto e Custódio 2005). Bancos de semente, uma maneira de conservação *ex situ*, têm se tornado uma boa opção (Allem, 2001). Neles, a temperatura é mantida, geralmente, a -20°C e o conteúdo de água das sementes é reduzido a cerca de 5-8%, isto para evitar a ação de patógenos e reduzir os processos metabólicos que envelhecem a semente e reduzem sua viabilidade. Testes de viabilidade das sementes armazenadas, como germinação *in vitro*, são indispensáveis para avaliar a confiabilidade do banco de sementes. As vantagens destes bancos de sementes se concentram no fato de manter sementes de inúmeras espécies em um pequeno espaço físico, com capacidade para serem germinadas e originarem novas plantas. Além disso, a diversidade biológica do material é mantida com a utilização de sementes como fonte de explantes (Machado neto e Custódio 2005).

Métodos de propagação *in vitro* se tornaram muito comuns para a multiplicação de muitas plantas, como as orquídeas. A utilização de folhas como explante, garante vários benefícios como a clonagem do material e a sobrevivência da planta-matriz (George et al. 2008). Outro explante que tem sido utilizado com sucesso é o protocormo, seja inteiro, com o ápice retirado ou “thin cell layer” – TCL (Silva e Tanaka 2006; Naing et al. 2011). O protocormo é uma estrutura resultante da germinação das orquídeas, e além de ser juvenil é meristemático (Pridgeon et al. 1999). O sistema de TCL consiste de explantes de tamanho pequeno retirados de diferentes órgãos vegetais, tanto longitudinal quanto transversalmente, contendo

assim apenas um tipo de tecido (longitudinal) ou dois ou mais tipos (transversal) (Altamura et al. 2003).

Inúmeras possibilidades para a manutenção da diversidade de orquídeas vêm sendo exploradas. Esta numerosa família botânica com grande importância econômica e ecológica apresenta uma quase infinita fonte de pesquisa a ser explorada, levando-se em conta o grande número de espécies que apresentam informações escassas ou inexistentes.

Considerando-se as tecnologias e necessidades atuais, o objetivo principal deste trabalho foi estabelecer estratégias de conservação *ex situ* e *in vitro* para as espécies *Epidendrum secundum* Jacq. e *Bulbophyllum peri* Schltr. (Orchidaceae).

Para isto, alguns objetivos específicos foram definidos:

- a) Testar a viabilidade das sementes sem armazenamento e armazenadas a -20°C no banco de sementes, por meio de testes de germinação após 4, 8 e 12 meses;
- b) Testar o meio de cultura mais apropriado para a germinação *in vitro* destas espécies;
- c) Determinar a melhor concentração de 6-benzilaminopurina (BAP) para induzir a formação de estruturas semelhantes à protocormos a partir de folhas e protocormos cultivados *in vitro* de ambas as espécies;
- d) Estabelecer o melhor regime de luz para a formação de estruturas semelhantes à protocormos;
- e) Determinar o melhor substrato de transplântio e metodologia de aclimatização de mudas.

REFERÊNCIAS

- Allem AC (2001) Managing genebanks: seed base collection examined. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 48.
- Altamura MM, Torrigiani P, Falasca G, Rossini P, Bagni N (1993) Morphofunctional gradients in superficial and deep tissues along tobacco stem: polyamine levels, biosynthesis and oxidation, and organogenesis in vitro. *Journal of Plant Physiology* 142, 543-551
- Fonseca GAB (1992) Biodiversity. In: *Ecology in Brazil: myths and realities*. Ed. Jornal do Brasil, Rio de Janeiro.
- George EF, Hall MA, Klerk GD (2008) Plant propagation by tissue culture. v.1. The Background, 3ed. Springer, 501p.
- Hossain MM (2008) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. *African Journal of Biotechnology*, vol. 7. p. 3614-3619.
- Junghans TG, Souza A da S (2009) Aspectos práticos da micropropagação. Cruz das Almas: Emprapa Mandioca e Fruticultura Tropical.
- Machado-Neto NB, Custódio CC (2005) Orchid Conservation through seed banking: ins and outs. *Selbyana*, v. 26, n. 1.
- Pansarin ER, Amaral, MCE (2008) Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*, v. 10.
- Peixoto AL, Rosa MMT da, Silva IM (2002) Caracterização da Mata Atlântica. In: Manual Metodológico para estudos botânicos na Mata Atlântica. Edur: Seropédica, RJ.
- Smidt, E. C. (2007) Filogenia e revisão taxonômica de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) ocorrentes no Neotrópico. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.
- Sopalun K, Thammasiri K, Ishikawa K (2010) Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum speciosum* blume. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, v. 101, p. 143-150.
- Souza VC, Lorenzi H (2005) Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2005.
- Stancik JF, Goldenberg R, Barros F de. (2009) O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta bot. bras.*, v. 23.

Capítulo I

Epidendrum secundum*: viabilidade de sementes e germinação *in vitro

RESUMO

A germinação assimbiótica *in vitro* de orquídeas associada a bancos de sementes é uma alternativa para a conservação *ex situ* de várias espécies que se encontram em extinção ou que apresentam potencial ornamental. O objetivo deste estudo foi determinar o melhor meio de cultura para a germinação *in vitro* e testar a viabilidade ao longo do tempo de sementes armazenadas a -20°C para manutenção de um banco de sementes e produção de mudas de *E. secundum*. Os meios de cultura testados para a germinação foram WPM, MS, MS/2 e Knudson C, sendo este último adicionado também de BAP (0,55; 1,10 e 2,20 µM). O meio WPM foi o mais adequado para a germinação, promovendo altas porcentagens de germinação, variando de 100% em sementes sem armazenamento até 73,8% em sementes armazenadas por 12 meses, além das plantas apresentarem crescimento mais rápido e vigoroso. Tanto o meio de cultura como o período de armazenamento influenciaram na viabilidade das sementes. Após o armazenamento, houve redução no índice de velocidade de germinação e índice de crescimento, indicando diminuição na qualidade das sementes armazenadas. Para o crescimento dos protocormos e desenvolvimento de plântulas foi utilizado o meio WPM e não foi necessário adicionar reguladores vegetais. As mudas foram transplantadas em bandejas de semeadura e as melhores respostas foram obtidas com substrato Plantmax florestal® e vermiculita (1:2), sendo que após 90 dias ocorreu 100% de sobrevivência em casa de vegetação. A germinação assimbiótica *in vitro* de *E. secundum* deve ser realizada em meio de cultura WPM, logo após a colheita de sementes ou até 12 meses de armazenamento, não sendo necessária a inclusão de reguladores vegetais para acelerar a germinação ou para obtenção de plantas.

Palavras-chave: banco de sementes; armazenamento; Orchidaceae; cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

The *in vitro* assymbiotic germination of orchids associated with genebanks is an alternative to *ex situ* conservation of various species in risk of extinction or with commercial value. The objective of this study was to establish the best culture medium for *in vitro* germination and test the seed viability after storage at -20 ° C to maintain a seedbank and produce plantlets of *Epidendrum secundum*. The culture media tested for germination were WPM, MS, MS/2 and Knudson C, the latter being also added BAP (0.55, 1.10 and 2.20 µM). The WPM medium was best suited for germination, promoting higher germination percentages, ranging from 100% in fresh seeds till 73.8% in stored seeds for 12 months, as well showing plants with faster and more vigorous growth. Both the culture medium and the storage period affected the viability. After storage, a reduction at the germination percentage, germination velocity index and growth index was observed, indicating a decrease in the quality of the stored seeds. For protocorm and plants growth the WPM medium was used and no growth regulators were added. The seedlings were transplanted into trays and the best results were obtained with Plantmax florestal® e vermiculite (1:2), and after 90 days, 100% of the plants survived in the greenhouse. The *in vitro* assymbiotic germination of *E. secundum* should be performed in WPM, with fresh seeds or stored seeds up to 12 months, and it is not necessary to add any plant growth regulators to accelerate germination or plant formation.

Keywords: seedbank; storage; Orchidaceae; *in vitro* culture.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Epidendrum* L., com aproximadamente 1.000 espécies, ocorre desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (Rasmussen 1985). A espécie *E. secundum* Jacq. pode ser encontrada como epífita, terrestre ou rupícola em diversos ecossistemas do Paraná (Stancik et al. 2009). As flores de *E. secundum* ocorrem em racemo e apresentam coloração lilás a rósea, atingindo 12 a 80 flores por inflorescência durante o ano todo (Stancik et al. 2009). Ocorre em áreas que vêm sofrendo constante degradação (Fonseca 1992; Myers et al. 2000; Camargo et al. 2002) por esta razão é uma espécie de interesse para determinação de estratégias de conservação *ex situ* e estabelecimento de protocolo de micropropagação.

Embora a conservação de espécies seja mais efetivamente alcançada por meio de gerenciamento *in situ* de populações, técnicas *ex situ* muitas vezes são a melhor ou a única opção (Ramsay et al. 2000). No caso das orquídeas, a dificuldade das sementes destas plantas germinarem na natureza é alta, pois geralmente não possuem reservas nutritivas, requerem uma associação simbiótica com micorrizas e apresentam crescimento lento (Dressler 1981).

Apesar da aplicação de técnicas *in vitro* apresentarem importância para a conservação de espécies, o uso de germoplasma conservado para pesquisa e disseminação deste conhecimento não têm sido tão incentivado quanto para espécies de interesse comercial (Sarasan et al. 2006). Por exemplo, banco de sementes está apenas no começo para as orquídeas, apesar da popularidade das mesmas, com poucos estudos empíricos e uma falta de informações gerais que norteiem as ações, diferentemente das abordagens sofisticadas desenvolvidas para bancos de sementes de outras plantas cultivadas (Swarts e Dixon 2009). Nos bancos de sementes são necessários que sejam realizados testes de viabilidade de lotes de sementes ao longo do tempo, para verificar a qualidade fisiológica das mesmas, ou seja, se ainda apresentam potencial germinativo. Entre os testes que podem ser realizados, o de germinação em condições controladas de laboratório possibilita a expressão máxima do poder germinativo e vigor das sementes, sem que ocorram interferências externas (Ferreira e Borghetti 2004).

A micropropagação de orquídeas com propósito conservacionista enfrenta problemas como a falta de protocolos eficientes e confiáveis para a germinação de sementes, entendimento das fases de crescimento e desenvolvimento inicial da plântula, alta mortalidade das plantas durante aclimatização e alternativas para a necessidade de uma associação micorrízica durante a germinação natural (Hossain et al. 2009).

A germinação *in vitro* pode ajudar na compreensão das respostas *in situ* da planta às condições ambientais e proporcionar informações básicas sobre o desenvolvimento e crescimento inicial das plântulas (Dutra et al. 2008), especialmente quando aliada à estudos anatômicos. Segundo Dressler (1993) a morfoanatomia é fundamental para a caracterização de espécies. A anatomia pode ser uma ferramenta para a diferenciação entre espécies com características muito similares (Mayr 1989), como por exemplo, a classificação da espécie *Epidendrum secundum* é bastante controversa, especialmente relacionada à espécie *E. denticulatum* (Pinheiro e Barros 2007).

A germinação assimbiótica tem se mostrado uma ferramenta eficiente para a produção de orquídeas com propósitos de conservação e de reintrodução no ambiente natural, sendo que um dos principais fatores testados é a influência de diferentes meios de cultura (Lo et al. 2004; Yamazaki e Miyoshi 2006; Dutra et al. 2008; Dutra et al. 2009; Hossain et al. 2009; Ávila-Díaz et al. 2009; Vogel e Macedo 2010). Como descrito por Pierik (1988), o meio Knudson C (Knudson 1946) é bastante utilizado na germinação de vários gêneros de orquídeas, assim como também o meio MS (Murashige e Skoog 1962). Como a formulação do meio MS apresenta alta concentração de sais, o ideal é testar formulações com a concentração de sais reduzida pela metade ou a um quarto. Além disso, o meio WPM ("woody plant medium" - Lloyd e McCown 1980) foi bem sucedido para a germinação e crescimento de alguns gêneros de orquídea testados no laboratório de micropropagação da Universidade Federal do Paraná (dados não publicados). Outros autores também demonstraram os benefícios deste meio para orquídeas, como Araújo et al. (2006) que obtiveram melhores resultados para propagação *in vitro* de plântulas de orquídea *Bc* 'Pastoral' x *Lc* 'Amber Glow'.

Um dos poucos trabalhos relacionados com germinação de *Epidendrum* foi o de Hossain (2008) que obteve cerca de 50% de germinação de *Epidendrum ibaguense* nos meios de cultura MS e KC. Quando os meios foram acrescidos de 6-

benzilaminopurina (BAP), apenas no meio MS houve aumento na porcentagem de germinação (75%). Com a espécie *E. secundum* foi realizado um estudo de germinação simbiótica por Pereira et al. (2011), no qual a germinação do controle (sem o fungo micorrízico) foi zero e nos meios adicionados com o fungo, a germinação não ultrapassou 31%.

Após a fase de germinação, os explantes de orquídeas são subcultivados para meio de cultura sem regulador, em geral meio MS, para promover alongamento e enraizamento (Dutra et al. 2009; Ávila-Díaz et al. 2009; Hossain et al. 2009).

De acordo com Hazarika (2006) a cultura *in vitro*, devido a suas condições especiais de alta umidade no interior do frasco de cultivo, promove a formação de plântulas de morfologia, anatomia e fisiologia, muitas vezes, anormais. Isto se torna evidente na etapa de transplântio das plântulas do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*. Essa passagem crítica, da fase *in vitro* para a casa de vegetação, deve-se basicamente aos fatores de estresse hídrico, fotossíntese, absorção de nutrientes e fitossanidade. O transplântio das plântulas deve ser num substrato que lhe propicie boas condições para o seu melhor desenvolvimento durante a aclimatização (Moraes et al. 2002). No Brasil, vários substratos para orquídeas têm sido testados com intuito de encontrar substitutos ao xaxim, que era largamente utilizado. Alguns exemplos de substratos são esfagno, carvão, fibra de coco e Plantmax® (Meneguice et al. 2004; Loni et al. 2008; Macedo et al. 2011).

Desta maneira, o objetivo desse trabalho foi investigar a capacidade germinativa de sementes em diferentes meios de cultura, a viabilidade após armazenamento por diferentes períodos, bem como avaliar o crescimento *in vitro* para acelerar a produção de mudas de *E. secundum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POLINIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

O processo de polinização manual de *Epidendrum secundum* foi realizado no Instituto Botânico de São Paulo (São Paulo, SP) em maio de 2010 (plantas 17.480 e 17.672). Os frutos estavam maduros e iniciando deiscência após cerca de 180-190 dias da polinização. As cápsulas maduras foram coletadas e levadas ao laboratório para suas sementes passarem pelo processo de secagem, armazenamento no banco de sementes e germinação *in vitro*.

O protocolo de secagem e armazenamento de sementes seguiu as indicações de Seaton e Ramsay (2005). As cápsulas foram lavadas com água corrente e sabão, sendo o fruto cortado no sentido longitudinal, raspando as sementes sobre uma placa de Petri. A mesma foi colocada em dessecador de vidro, contendo solução saturada de cloreto de cálcio (CaCl_2). O dessecador foi mantido em temperatura ambiente por sete dias. Rapidamente as sementes foram transferidas para pequenos frascos de vidro, etiquetados e armazenados em frascos de vidro maiores, juntamente com sílica laranja, usada como indicador de umidade dentro do frasco. Após este processo, as sementes foram armazenadas a -20°C , para testes posteriores de viabilidade aos 4, 8 e 12 meses de armazenamento. Sementes recém colhidas também tiveram sua viabilidade testada por meio de germinação *in vitro*.

2.2 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO, DO MEIO DE CULTURA E DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E FORMAÇÃO DE PROTOCORMOS

As sementes foram desinfestadas em solução de 0,75% de hipoclorito de sódio (NaOCl), acrescido de 0,1% de Tween 20 por dez minutos. Em seguida foram realizadas quatro lavagens com água destilada autoclavada. Posteriormente, as sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo 30 mL dos meios de

cultura: MS, MS/2, WPM e KC. Os meios MS, MS/2 (com metade da concentração de sais) e WPM foram suplementados com 100 mg.L⁻¹ de inositol, 0,5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina HCl e 2 mg.L⁻¹ de glicina. A tiamina foi adicionada na concentração 0,1 mg.L⁻¹ nos meios MS e MS/2 e 1 mg.L⁻¹ no WPM. O meio KC não foi suplementado com vitaminas e inositol (Anexo I).

Diferentes concentrações de BAP (0,55; 1,10 e 2,20 µM) foram acrescidas no meio KC para avaliação da porcentagem de germinação. O tratamento controle foi o meio KC sem adição de reguladores vegetais.

As placas com as sementes foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27°C±2°C durante o dia e 18°C±2°C durante a noite, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 40 µmol. m⁻².s⁻¹.

As avaliações foram realizadas aos 15, 30, 45 e 60 dias após inoculação das sementes nos meios de cultura, considerando-se as seguintes variáveis: porcentagem de germinação; fases de desenvolvimento dos protocormos classificadas em: (1) semente viável (inchada com testa), (2) germinação (inchada com testa rompida), (3) protocormo com rizóides, (4) protocormo com rizóides e ápice caulinar, (5) plântula com uma folha e (6) plântula com duas ou mais folhas; índice de crescimento (IC), adaptado de Otero et al. (2004; 2005), por meio da fórmula:

$$IC = \frac{N_1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4 + N_5 \times 5 + N_6 \times 6}{N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5 + N_6}$$

na qual N₁ é o número de sementes no estágio 1, N₂ é o número de sementes no estágio 2, etc.; índice de velocidade de germinação (IVG) criado por Maguire (1962) e simplificado por Hosomi et al. (2011):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} + \frac{G_4}{N_4}$$

na qual de G₁ a G₄ é a quantidade de sementes germinadas em cada período de contagem e de N₁ a N₄ é a quantidade de dias em cada período de contagem.

2.3 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO

Plantas apresentando duas folhas ou mais foram transferidas para meio de cultura WPM, sem regulador vegetal para indução do alongamento e enraizamento. Foram realizados quatro subcultivos para o mesmo meio de cultura, a cada 60 dias.

Plantas com altura de cerca de 2 cm, com 4 a 6 folhas foram transplantadas em bandejas de semeadura contendo diferentes substratos: Plantmax florestal® e vermiculita (PV; 1:2), sphagnum e fibra de coco (SF; 2:1) e carvão e fibra de coco (CF; 2:1). Inicialmente as plantas aclimatizadas foram mantidas sob plástico transparente e tela de sombrite 50% para manter a umidade e evitar o excesso de luminosidade. Após 10 dias apenas o sombrite foi mantido, sendo este retirado aos 30 dias após o transplântio.

No momento do plantio foi registrado o número médio de folhas, número médio de raízes, altura média da parte aérea (do colo à porção apical do eixo principal) e massa fresca das plantas para serem comparadas com as médias após 90 dias. A temperatura média da casa de vegetação nos meses do experimento, entre 20 de julho e 20 de outubro, foi de 23,5°C ao meio dia, variando ao longo do dia entre 9,1 e 28,8°C. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada aos 60 e 90 dias.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para todos os experimentos. Para a germinação *in vitro* foram realizadas cinco repetições, sendo duas placas por repetição com 100 sementes avaliadas por placa, tendo o meio de cultura e tempo de armazenamento arranjado fatorialmente (4x4). O experimento de aclimatização consistiu de oito repetições com cinco explantes cada. Os resultados foram, então, submetidos à análise de estatística descritiva e comparação de médias pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade. A análise dos dados foi realizada pelo programa Sisvar® (Ferreira 2000).

2.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O material germinado a partir de sementes sem armazenamento foi fixado em glutaraldeído 25% em tampão fosfato pH 7,2 por 24 horas, sendo transferido para etanol 70% até utilização. A inclusão em historresina seguiu as instruções do fabricante Leica®. Cortes em micrótomo com 0,7 µm de espessura foram corados com azul de toluidina (O'Brien *et al.*, 1965). As lâminas coradas foram analisadas em microscópio fotônico.

3. RESULTADOS

3.1 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO, DO MEIO DE CULTURA E DE BAP NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E FORMAÇÃO DE PROTOCORMOS

A germinação de sementes sem armazenamento de *E. secundum* foi eficiente independente do meio de cultura utilizado, apesar dos meios apresentarem diferentes composições de nutrientes (Anexo I). A interação entre meio de cultura e armazenamento foi significativa ($p \leq 0,05$), demonstrando que ao longo do tempo de armazenamento a germinação das sementes não foi uniforme entre os meios (Anexo 2). Após quatro, oito e doze meses de armazenamento a -20°C houve diminuição nos valores de germinação para todos os meios de cultura, diferindo significativamente das sementes sem armazenamento. As maiores porcentagens de germinação foram obtidas com o meio WPM e as mais baixas com o meio MS, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Epidendrum secundum*, SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A -20°C, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO

Meios de cultura	Germinação (%)			
	Sem armazenamento	4 meses*	8 meses*	12 meses*
KC	99,5 a A	86,0 b B	81,4 b B	53,8 b C
MS	99,4 a A	74,8 c B	72,8 c B	35,6 c C
MS/2	100,0 a A	79,2 c B	75,8 bc B	49,6 b C
WPM	100,0 a A	92,4 a B	91,2 a B	73,8 a C

* Tempo de armazenamento a – 20°C;

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

A utilização de BAP no meio KC reduziu a germinação em relação ao controle que não foi acrescido do regulador. Pode-se observar na tabela 2 que, quanto maior a concentração de BAP utilizada, menor foi a porcentagem de germinação.

Tabela 2. GERMINAÇÃO DE SEMENTES SEM ARMAZENAMENTO DE *Epidendrum secundum* NO MEIO KNUDSON C ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP APÓS 60 DIAS DE CULTIVO

BAP (uM)	Germinação (%)
0,00	99,5 a
0,55	86,1 b
1,10	78,1 bc
2,20	75,7 c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Houve redução na porcentagem de germinação ao longo do tempo de armazenamento e, da mesma maneira, o IVG diminuiu e diferiu estatisticamente em cada tempo de armazenamento, como pode ser visto na tabela 3. Sementes sem armazenamento apresentaram maior velocidade e uma diminuição gradativa nestes valores de IVG foi observada até 12 meses de armazenamento. Considerando-se apenas os meios de cultura, em sementes sem armazenamento as maiores velocidades de germinação foram obtidas nos meios WPM e KC (11,56 e 11,47, respectivamente), seguidos do meio MS/2, que apresentou IVG de 10,56 e MS com o menor índice de 9,84. O meio WPM foi superior tanto para a porcentagem de germinação, como também quanto ao IVG, no qual se manteve sempre superior aos demais meios em todos os tempos de armazenamento. O meio de cultura MS foi o pior apresentando baixos valores de IVG (Tabela 3).

Tabela 3. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE PROTOCORMOS DE *E. secundum* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E APÓS TEMPOS DE ARMAZENAMENTO A -20°C

Meio	IVG			
	Sem armazenamento	4 meses armazenamento	8 meses armazenamento	12 meses armazenamento
KC	11,5 aA	9,3 bB	6,7 bC	2,7 bD
MS	9,8 cA	7,6 cB	5,8 cC	1,7 cD
MS2	10,6 bA	8,1 cB	6,1 cC	3,0 bD
WPM	11,6 aA	9,9 aB	7,8 aC	5,3 aD

Letras minúsculas iguais na coluna e letras maiúsculas iguais na linha não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

O índice de crescimento demonstrou a capacidade das sementes germinadas de passarem para fases posteriores de crescimento, classificadas em seis fases. À medida que o período de cultivo avançou, maiores foram os valores de IC, indicando com isto que fases mais avançadas de crescimento estavam surgindo (Fig 1). A tendência dos resultados em todos os meios foi a mesma, no geral os meios de cultura que promoveram maior crescimento de *E. secundum* foram WPM com índice médio de 3,62 e KC com 3,60, superiores estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$) ao dos meios MS/2 (3,44) e do MS (3,36).

Aos 60 dias de avaliação, o IC das sementes sem armazenamento foi semelhante nos diferentes meios de cultura testados, sendo que para WPM e KC foi de 6 e o dos meios MS e MS/2 foi 5,9 (tabela 4). À medida que as sementes foram armazenadas houve redução e atraso no crescimento. Após oito meses de armazenamento se manteve a redução do IC, sendo maior após 12 meses de armazenamento atingindo valores próximos de 5 em todos os meios de cultura testados, após 60 dias de cultivo.

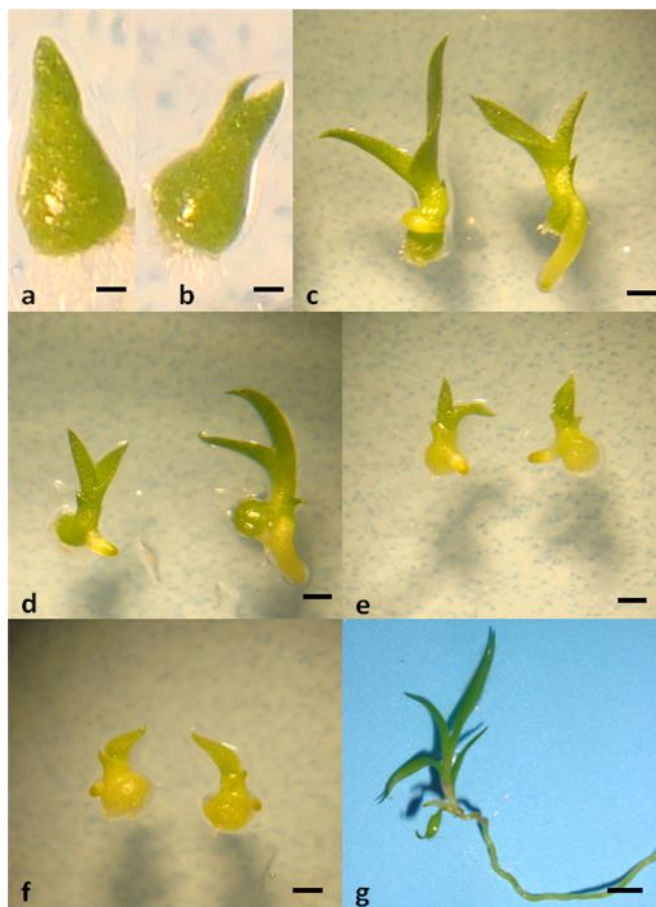
Tabela 4. ÍNDICE DE CRESCIMENTO DE PROTOCORMOS DE *E. secundum* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E DIAS DE CULTIVO EM SEMENTES SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A -20°C

Dias de cultivo	Armazenamento (meses)	Meio			
		KC	MS	MS/2	WPM
15	0	2,09 h A	1,84 j B	1,65 j C	2,06 h A
15	4	1,92 h AB	1,73 j C	1,80 j BC	1,98 h A
15	8	1,18 i AB	1,17 k B	1,23 k AB	1,32 i A
15	12	1,21 i AB	1,11 k B	1,28 k A	1,31 i A
30	0	3,38 f A	2,84 h C	2,94 h BC	3,02 f B
30	4	3,01 g A	2,62 i B	2,70 i B	2,91 f A
30	8	2,82 g A	2,53 i C	2,57 i BC	2,68 g AB
30	12	2,03 h AB	1,83 j C	1,93 j BC	2,15 h A
45	0	5,05 c A	4,56 d C	4,66 d BC	4,80 c B
45	4	4,56 d A	4,35 e B	4,30 e B	4,70 c A
45	8	4,00 e B	3,76 f C	3,83 f C	4,42 d A
45	12	3,92 e A	3,55 g B	3,63 g B	3,65 e B
60	0	5,99 a A	5,89 a A	5,90 a A	5,99 a A
60	4	5,83 ab AB	5,78 a B	5,71 a B	5,97 a A
60	8	5,67 b B	5,39 b C	5,45 b C	5,83 a A
60	12	5,05 c B	5,09 c AB	5,22 c A	5,05 b B
IC geral		3,61	3,36	3,44	3,62

Letras minúsculas iguais na coluna e letras maiúsculas iguais na linha não diferiram estatisticamente entre os valores de IC pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

De acordo com as avaliações de germinação e crescimento dos protocormos realizadas a cada quinze dias, foi observado maior vigor das plantas no meio WPM, seguido de MS/2, MS e, por último, KC (Fig 1). Segundo Ferreira e Borghetti (2004) o vigor é definido como as propriedades da semente que determinam o potencial para uma emergência rápida e uniforme para o desenvolvimento de plântulas normais sob um largo espectro de condições ambientais. Juntamente com a análise visual de coloração e tamanho das plântulas, no meio KC as mesmas eram menos vigorosas.

Fig 1. CRESCIMENTO DE *E. secundum* A PARTIR DE SEMENTES SEM ARMAZENAMENTO: **a.** PROTOCORMO NO MEIO WPM COM PRIMEIRA FOLHA SE FORMANDO; **b.** PLANTULA NO MEIO WPM COM SEGUNDA FOLHA SE FORMANDO; **c-f.** PLÂNTULAS ENRAIZADAS COM CERCA DE 60 DIAS CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA; **c.** WPM; **d.** MS/2; **e.** MS; **f.** KC; **g.** PLANTA COM CERCA DE 8 MESES EM MEIO WPM EM FASE DE ACLIMATIZAÇÃO. BARRA: **a, b** = 0,1 mm; **c, d, e, f** = 1 mm; **g** = 1 cm.



3.2 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO

Durante os primeiros sessenta dias já foram observadas raízes sendo formadas em todos os meios de cultura, não havendo necessidade de adição de regulador vegetal para indução do enraizamento. Ao final do segundo subcultivo, aos 120 dias, 100% das plantas estavam enraizadas no meio de cultura WPM.

Após oito meses, as plantas aclimatizadas tiveram altas porcentagens de sobrevivência nos três substratos testados. No entanto, a sobrevivência das plantas no substrato fibra de coco e carvão foi significativamente menor ($p \leq 0,05$) do que a das outras misturas de substratos (fig 2). Aos 90 dias não houve mais mortalidade das plantas.

Como pode ser visto na fig 3, houve aumento nos valores de massa fresca das plantas, em todos os substratos com diferença significativa do valor inicial para o final aos 90 dias, sendo as plantas do substrato Plantmax florestal® e vermiculita

(PV) as que obtiveram maior acréscimo (0,540 g) e diferiram estatisticamente das demais ($p \leq 0,05$).

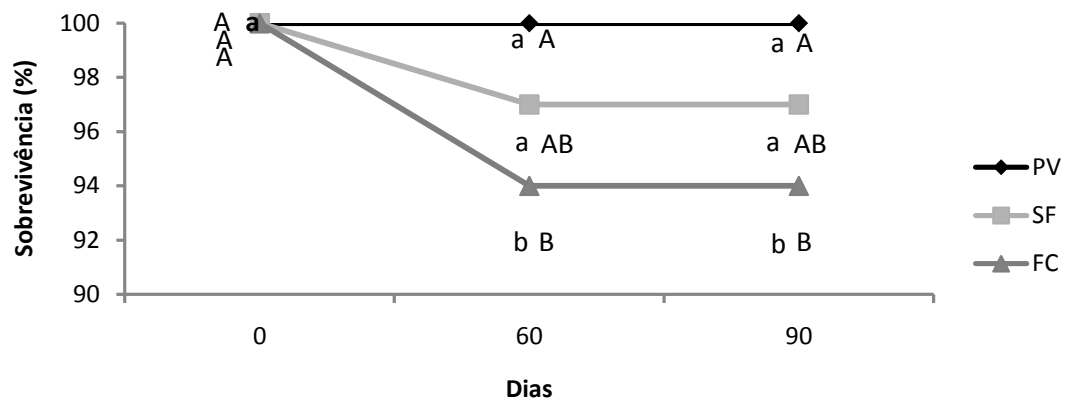


Fig 2. PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE PLANTULAS DE *E. secundum* NA ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO EM DIFERENTES SUBSTRATOS APOS OITO MESES DE CULTIVO *in vitro*. Letras minúsculas iguais em cada substrato e letras maiúsculas iguais entre os substratos não diferiram pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). PV = Plantmax florestal® + vermiculita (1:2); SF = sphagnum + fibra de coco (2:1); CF = carvão + fibra de coco (2:1).

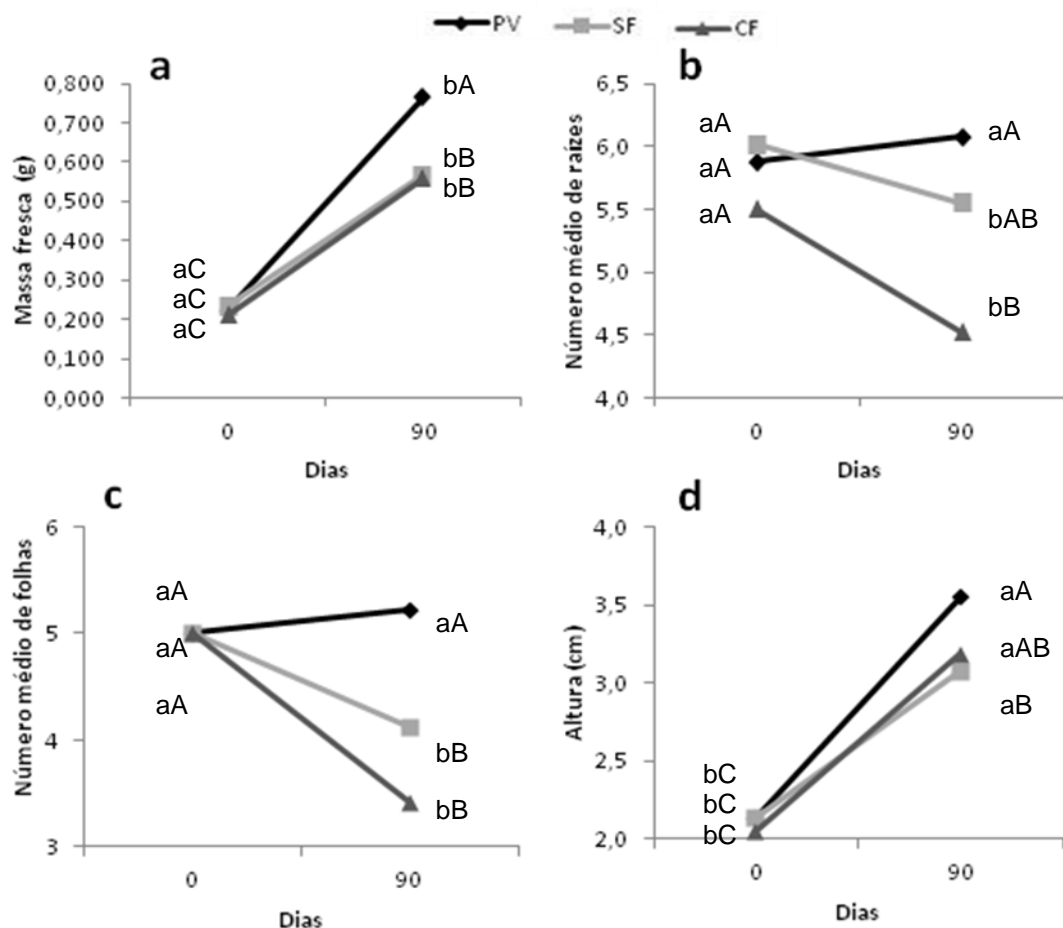


Fig 3. INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO NO CRESCIMENTO DE PLANTAS ACLIMATIZADAS DE *E. secundum*, APOS OITO MESES DE CULTIVO *in vitro*. Variável de um mesmo substrato seguida de letras minúsculas iguais e variável entre substratos diferentes seguida de letras maiúsculas iguais não diferiram pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). PV = Plantmax florestal® + vermiculita (1:2); SF = sphagnum + fibra de coco (2:1); CF = carvão + fibra de coco (2:1).

A diminuição no número médio de folhas e raízes pôde ser observada nas plantas dos substratos Sphagnum + fibra de coco e carvão + fibra de coco, devido à necrose e queda das folhas e necrose das raízes. Para plantas do substrato Plantmax floresta® + vermiculita, o número médio de folhas e raízes foi mantido. Houve incremento na altura das plantas em todos os substratos, as plantas mais altas ocorreram no substrato Plantmax floresta® + vermiculita (3,6 cm).

3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Inicialmente a semente absorveu água e inchou no meio de cultura. Após o rompimento da testa das sementes de *E. secundum* ainda pode-se observar a estrutura remanescente do suspensor (fig 4a). A estrutura globular apresentou coloração esverdeada com muitos cloroplastos e é basicamente formada por células parenquimáticas revestidas com uma camada de epiderme. Em seguida pode-se notar a formação de um órgão semelhante à crista (crestlike organ; fig 4b), e ao mesmo tempo, rizóides unicelulares foram observados na região mediana e inferior (fig 4c; 1a, 1b).

A partir desta fase, cordões procambiais já foram formados atravessando o protocormo desde a gema até a porção mediana. A formação de um segundo órgão semelhante à crista iniciou e em seguida, as primeiras folhas propriamente ditas se formaram, uma por vez (fig 4d, 4e). Os órgãos semelhantes à crista se uniram em volta das folhas em início de crescimento e formaram uma bainha (fig 1c). O último órgão a se formar foi a raiz, que é de origem endógena e cresce próxima a base do ápice caulinar. A conexão vascular se projetou do ápice caulinar para o meio do protocormo atravessando toda a raiz (fig 4f). Por fim, a estrutura globular começou a degenerar e uma plântula mais alongada pode ser observada (fig 1c, 1g).

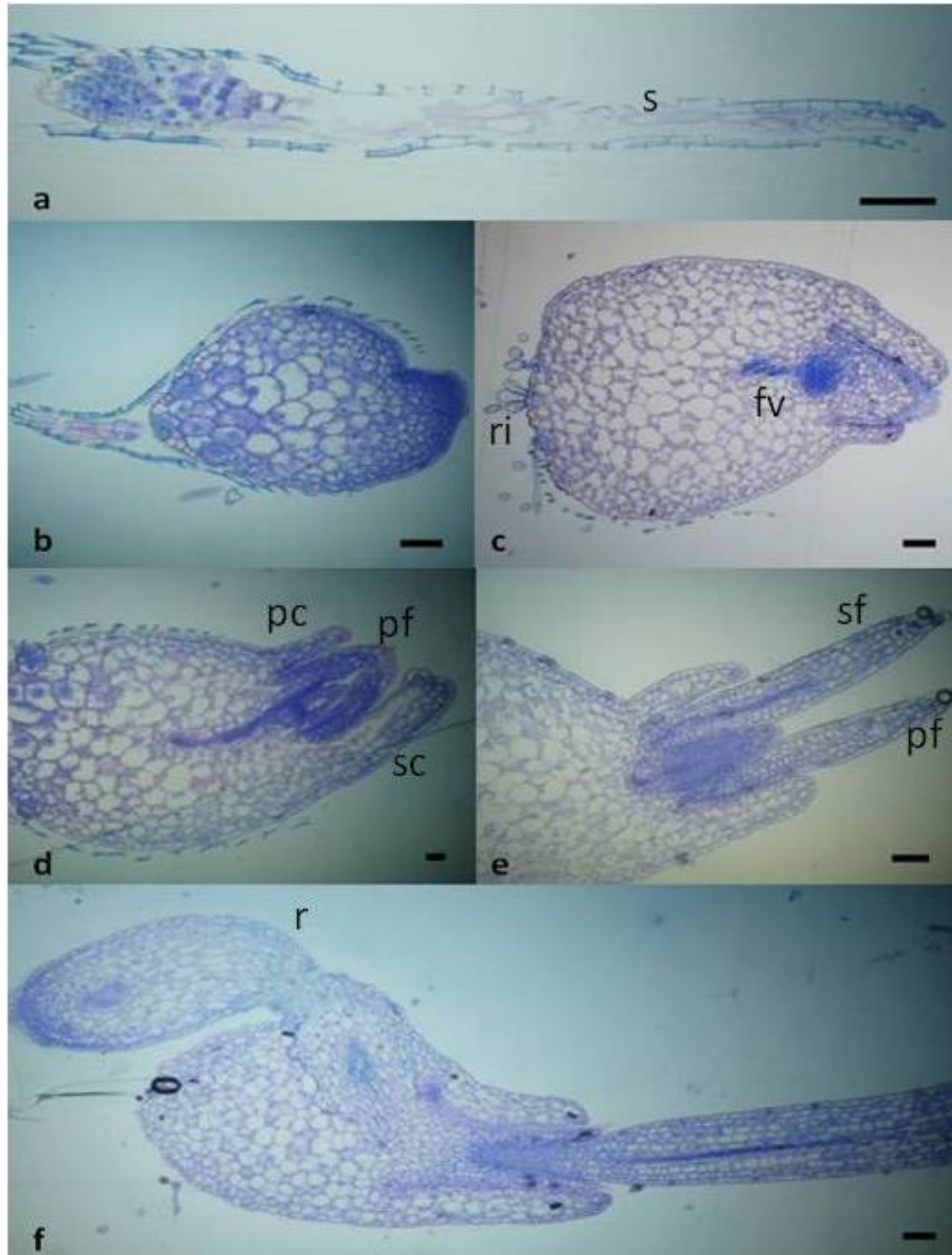


Fig 4. GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE *EPIDENDRUM secundum* EM MEIO WPM: *a.* SEMENTE INCHADA (FASE 1) COM REMANESCENTES DO SUSPENSOR; *b.* SEMENTE GERMINADA (FASE 2); *c.* PROTOCORMO COM ÁPICE FOLIAR, FEIXE VASCULAR EVIDENTE E RIZÓIDES (FASE 4); *d.* PLÂNTULA COM PRIMEIRA FOLHA SE DESENVOLVENDO (FASE 5) ENVOLVIDA PELA PRIMEIRA E SEGUNDA CRISTA; *e.* PLÂNTULA COM SEGUNDA FOLHA SE DESENVOLVENDO (FASE 6); *f.* PLÂNTULA ENRAIZADA. s: SUSPENSOR; fv: FEIXE VASCULAR; pc: PRIMEIRA CRISTA; sc: SEGUNDA CRISTA; pf: PRIMEIRA FOLHA; sf: SEGUNDA FOLHA; r: RAIZ. BARRA: 1mm.

4. DISCUSSÃO

Sementes sem armazenamento de *E. secundum* germinaram bem em todos os meios de cultura testados. Esta cultura assimbiótica promoveu germinação total das sementes, diferentemente de resultados encontrados por Pereira et al. (2011) que utilizando cultura assimbiótica de *E. secundum* como controle para culturas simbióticas, não obteve germinação em meio com ágar e aveia, com as sementes mantidas no escuro. A germinação máxima foi de 31%, em presença de fungo micorrízico e aos 44 dias de avaliação.

A viabilidade das sementes armazenadas a -20°C foi avaliada por meio de germinação *in vitro* e indicou perda ao longo do tempo. A porcentagem de germinação mostrou-se superior no meio WPM em relação aos outros meios de cultura independente do período de armazenamento. Uma maior redução na porcentagem de germinação ocorreu aos 12 meses de armazenamento. As sementes cultivadas no meio MS, após armazenamento entre oito e doze meses apresentaram uma redução de 72,8% para 35,6% de germinação. As inoculadas nos meios KC e MS/2 também tiveram a porcentagem de germinação bastante reduzida, de 81,4 para 53,8 e de 75,8 para 49,6, respectivamente, após os mesmos períodos de armazenamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Godo et al. (2010) que mantiveram sementes de *Calanthe tricarinata* armazenadas em temperatura de 5°C e houve redução na porcentagem de germinação de 69% aos quatro meses e para 13% aos 26 meses. Hay et al. (2010) testaram várias temperaturas de armazenamento, entre 23°C e -196°C, sendo que a mesma temperatura utilizada neste estudo para *E. secundum*, de cerca de -20°C, foi a ideal para a manutenção da viabilidade de sementes de várias espécies de orquídeas, como por exemplo *Diuris laxiflora*. No entanto, também foram observadas reduções nas porcentagens de germinação após armazenamento.

O fato do armazenamento de sementes de *E. secundum* ter reduzido a viabilidade pode ter sido devido ao envelhecimento de sementes. Problemas como envelhecimento e degradação das sementes de orquídeas ocorrem devido ao conteúdo de reserva das mesmas, que de acordo com Stancato et al. (1998) a pouca quantidade de reserva presente é constituída basicamente de ácidos graxos. Machado Neto e Custódio (2005) explicaram que estes compostos estão sujeitos a

peroxidação, processo baseado na ação nociva de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são geradas pela respiração. Na fisiologia de sementes, de acordo com Bailly (2004), o acúmulo de EROs leva a danos celulares e distúrbios no desenvolvimento ou no processo de germinação. Segundo Machado Neto e Custódio (2005), sementes armazenadas em condições que não são ideais podem estar sujeitas a este processo e perder a viabilidade.

A composição nutricional de cada meio também influenciou a germinação. O meio no qual houve maior porcentagem de germinação ao longo do período de armazenamento foi o WPM que apresenta concentrações intermediárias de íons importantes, como K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ e NO_3^- , comparado às concentrações dos meios MS, MS/2 e KC, evitando um possível excesso ou falta de sais.

De acordo com Pierik (1990) nitrogênio e potássio são os elementos mais importantes para os embriões, responsáveis por seu desenvolvimento normal. A concentração de K^+ no meio WPM é de 12,6 mM, se aproxima da concentração do meio MS/2 (10 mM), porém mais elevada quando comparada ao KC (1,8 mM) e inferior à do MS (20 mM). O potássio é também necessário para a divisão celular normal e promove crescimento meristemático (Sathyanarayana e Varghese 2007). A baixa concentração deste elemento no meio KC pode ter influenciado o baixo crescimento e vigor das plantas. Por outro lado, no caso das orquídeas, o excesso de sais pode ser prejudicial para o cultivo *in vitro*. Rasmussen (1995) explicou que isso se deve ao fato de que a maioria das orquídeas desenvolve-se em ambientes com baixa concentração de nutrientes, e as altas concentrações do meio MS podem ser inibitórias, como ocorreu para *Epidendrum secundum* neste trabalho.

O nitrogênio influencia o crescimento da planta em todas as fases. Os meios WPM, MS e MS/2 contêm a relação de nitrato e amônio de 2:1, enquanto o meio KC contém praticamente concentrações de 1:1, o que pareceu não afetar a germinação inicial, porém pode ter sido de grande influência no crescimento posterior do protocormo.

A falta de vigor dos explantes observado no meio KC também pode ser devido à falta de vitaminas, inositol e concentrações baixas de micronutrientes como boro, zinco e molibdênio. Em cultura de tecidos vegetais, o mio-inositol pode ser um precursor crucial nas vias biossintéticas, levando à formação de pectinas e hemiceluloses necessárias para a síntese das paredes celulares (Bhojwani e Razdan 1996). De acordo com George et al. (2008) o zinco está envolvido na

síntese de clorofila e o boro requerido nas atividades meristemáticas. Isto pode explicar a coloração verde mais clara e o tamanho reduzido das plântulas, sendo que estas deficiências não impediram a germinação.

A adição de BAP ao meio KC diminuiu a porcentagem de germinação de *E. secundum*. Em outro estudo com *Epidendrum ibaguense*, os resultados de germinação não foram influenciados pela adição de 4,4 μM de BAP no meio KC, mantendo 50% de germinação no controle e no meio com regulador (Hossain 2008). De acordo com Pauw et al. (1995) a resposta à citocinina vai depender de cada espécie. O requerimento de citocininas no meio de germinação pode estar relacionado à utilização dos lipídeos encontrados, porém de acordo com Mercier e Kerbauy (1991), as espécies de orquídeas que não requerem concentrações exógenas destes reguladores são as autônomas em citocinina, ou seja, contém altos níveis endógenos, como a espécie *E. fulgens*, do mesmo gênero do presente trabalho. Pode-se inferir que a adição de BAP no meio de cultura para germinação de espécies de orquídea autônomas cause certa toxidez e, conseqüentemente, reduza a porcentagem de germinação. A vantagem principal para este tipo de espécie autônoma, como parece ser o caso de várias espécies do gênero *Epidendrum*, é o menor custo para a técnica de germinação *in vitro*, sem a necessidade de adicionar reguladores.

O índice de velocidade de germinação indicou um atraso na germinação das sementes de *E. secundum* à medida que aumentou o tempo de armazenamento. Hosomi et al (2011) encontrou resultados semelhantes a estes em cinco espécies de *Cattleya* após três meses de armazenamento a -18°C . Os autores observaram a diminuição no IVG como indicativo negativo para o armazenamento à longo prazo.

O índice de crescimento proposto por Otero et al. (2004) foi utilizado para comparar o crescimento intraespecífico de sementes originadas de diferentes plantas e inoculados com fungo micorrízico, utilizando cultura assimbiótica como controle. Eles encontraram grandes diferenças na resposta de sementes de diferentes frutos. No presente trabalho houve uma tendência geral de crescimento que se manteve em todos os meios de cultura testados, aumentando a cada período de 15 dias de contagem (até 60 dias) e diminuindo a cada período de armazenamento (até 12 meses). O interessante a ser observado é que, de acordo com Machado Neto e Custódio (2005), o decréscimo nos valores de IVG é um dos primeiros passos no processo de deterioração da semente e, conseqüentemente,

para a diminuição da viabilidade. O mesmo conceito pode ser aplicado ao IC, sendo o seu decréscimo indicativo de atraso no crescimento das plântulas.

Após o crescimento *in vitro*, as plantas foram aclimatizadas em substratos de composição diferente, sendo o melhor resultado obtido no substrato Plantmax florestal® e vermicuita, que é formado por partículas menores. Isto contrasta com resultados encontrados para outras orquídeas, como *Cyrtopodium punctatum* (Dutra et al. 2009) que se desenvolveu melhor em casca de coco e de *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz et al. 2009) que preferiu substrato de tezontle com casca de carvalho, ou seja, substrato com partículas maiores. Porém, como há grande diversidade de espécies, habitats e requerimentos, o tipo de substrato deve ser adequado a cada espécie.

Quando a germinação ocorre na natureza, a semente pode absorver água, inchar e germinar, ou seja, romper a testa, porém, o protocormo permanece como tal até que seja infectado por um fungo micorrízico apropriado. Sob condições assépticas *in vitro*, o protocormo pode se desenvolver de maneira similar ao natural desde que seja adicionada uma fonte de carboidrato ao meio de cultura (Harrison 1977). O suspensor que pode ser visto em *E. secundum* é classificado por Chen (1982 apud Arditti 1992) como tipo III, ou seja, mais elaborado e formado por várias células. Na maturidade das sementes de orquídea geralmente o suspensor degenera (Arditti 1992), como foi observado no presente trabalho.

De acordo com Pridgeon (1999) a fase de protocormo inicia na germinação de sementes de orquídea e é a partir dele que os sistemas caulinares e radiculares se formam. A formação de órgão semelhante à crista ocorre da mesma maneira que Nishimura (1981) descreveu para *Phalaenopsis lueddemanniana*, na qual forma-se um primeiro agrupamento de células chamado de órgão semelhante à crista, depois um segundo órgão e, por fim, estas estruturas se unem e formam uma bainha ao redor das folhas. A formação dos rizóides ocorre antes da formação de folhas e raízes, e são importantes para o protocormo para a fixação em espécies epífitas e também absorção de nutrientes (Arditti 1992). De acordo com Kraus, Kerbauy e Monteiro (2006), os rizóides formados *in vitro* podem servir para a absorção dos nutrientes do meio de cultura, porém não necessariamente toda a nutrição do protocormo depende destes rizóides.

O último órgão a se formar em orquídeas é a raiz. Neste caso, a primeira raiz se originou muito próxima à gema caulinar. Da mesma maneira, Kraus, Kerbauy

e Monteiro (2006) observaram a primeira raiz de *Catasetum pileatum* se formando logo abaixo da gema. A gema é importante fonte de auxina, que é importante promotora de enraizamento (George et al. 2008). Acredita-se que a produção de auxina nessa região seja responsável por este comportamento encontrado em várias orquídeas (Kraus, Kerbauy e Monteiro, 2006).

Ao final da análise anatômica pudemos observar que o desenvolvimento de sementes de *Epidendrum secundum* até a formação da plântula segue as mesmas etapas de outras orquídeas já estudadas (Arditti 1992; Kraus, Kerbauy e Monteiro 2006), variando em poucos aspectos. Deve-se considerar a etapa em si, e não a quantidade de dias necessários para a formação de cada órgão. Pois como visto neste trabalho, as sementes armazenadas germinam mais lentamente, porém apresentam morfologia normal.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o meio de cultura WPM é adequado para germinação e crescimento *in vitro* de *E. secundum*, não necessitando de adição BAP para a germinação e regulador vegetal para promover a enraizamento. Para fins de conservação de germoplasma em banco de sementes, podem-se armazenar as sementes até um ano a -20°C com manutenção da viabilidade, de acordo com os testes realizados. Para transferir as plantas do ambiente *in vitro* para *ex vitro*, recomenda-se utilizar como substrato Plantmax florestal® e vermiculita.

6. REFERÊNCIAS

- Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons, New York.
- Arditti J, Ernst R (1993) Micropropagation of orchids. New York: J. Wiley.
- Ávila-Díaz I, Oyama K, Gomez-Alonso C, Salgado-Garciglia R (2009) *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 99, n. 3.
- Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research, v.14, p. 93-107.
- Bhojwani SS, Razdan MK (1996) Plant tissue culture: Theory and Practice, a revised edition. Elsevier Science.
- Camargo A, Capobianco JPR, Oliveira JAP (2002) Meio ambiente Brasil: avanços e obstáculos pós-Rio-92. São Paulo Instituto Socioambiental; Rio de Janeiro Fundação Getúlio Vargas.
- Dressler RL (1981) The orchids. Natural history and classification. Harvard Univ. Press: Cambridge, Mass. and London, England. 332 p.
- Dressler RL (1993) Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland, OR.
- Dutra D, Johnson TR, Kauth PJ, Stewart SL, Kane ME, Richardson L (2008) Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. Plant Cell Tiss Organ Cult, v. 94.
- Dutra D, Kane ME, Richardson L (2009) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. Plant Cell Tiss Organ Cult, n. 96.
- Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria (RBRAS), 45. São Carlos, SP. Anais. São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258.
- Ferreira AG, Borghetti F (2004) Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed
- Fonseca GAB (1992) Biodiversity. In: Ecology in Brazil: myths and realities. Ed. Jornal do Brasil, Rio de Janeiro
- George EF, Hall MA, Klerk GD (2008) Plant propagation by tissue culture. v.1. The
- Godo T, Komori M, Nakaoki E, Yukawa T, Miyoshi K (2010) Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant 46:323–328

- Harrison CR (1977) Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). Botanical Gazzette 138: 41-45
- Hay FR, Merritt DJ, Soanes JA, Dixon KW (2010) Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. Botanical Journal of the Linnean Society, 164: 26-41
- Hazarika BN (2006) Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Sci. Hortic. 108, 105–120
- Hosomi ST, Custódio CC, Seaton PT, Marks TR, Machado-Neto NB (2011) Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. DOI 10.1007/s11627-011-9404-1
- Hossain MM (2008) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 20
- Hossain MM, Sharma M, Pathak P (2009) Cost effective protocol for *in vitro* mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. – a medicinally important orchid. Eng. Life Sci., v. 9, n. 6
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin, 14: 214- 217
- Kraus JE, Kerbauy GB, Monteiro WR (2006) Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb.f. in vitro: aspectos estruturais e conceituais. Hoehnea 33: 177-184.
- Lloyd G, Mccown B (1980) Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. HortScience, Alexandria, v. 15, p. 416
- Lo SF, Nalawade SM, Kuo CL, Chen CL, Tsay HS (2004) Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid. In vitro Cell. Biol. – Plant, v. 40
- Lone AB, Barbosa CM, Takahashi LSA, Faria RT (2008) Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. Acta Scientiarum Agronomy, v.30, p.465-469
- Macedo MC, Rosa YBCJ, Scalón SPQ, Rosa Júnior EJ, Vieira MC, Tatara MB (2011) Substratos e intensidades de luz no cultivo de orquídea denfal. Horticultura Brasileira 29: 168-173
- Machado-Neto NB, Custódio CC (2005) Orchid Conservation through seed banking: ins and outs. Selbyana, v. 26, n. 1.
- Mayr E (1989) O desenvolvimento do pensamento biológico: diversidade, evolução e herança. Brasília, EDUNB (Editora Universidade de Brasília)

- Meneguice B, Oliveira RBD, Faria RT (2004) Propagação vegetativa de *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) em Substratos Alternativos ao Xaxim. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 25, n. 1, p. 33-38
- Mercier H & Kerbaur GB (1991) Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. *Journal of Plant Physiology*, 138: 195-199
- Moraes LM, Cavalcante LCD, Faria R T (2002) Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.24, n.5, p.1397-1400
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca, GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858
- Nishimura G (1981) Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. *Botanical Gazette* 142: 306-365
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2004) Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Mol. Ecol.* 13, 2393–2404
- Otero JT, Bayman P, Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. *Evolutionary Ecology* 19:29–43
- Pauw MA de, Remphrey WR, Palmer CE (1995) The cytokinin preference for in vitro germination and growth of *Cypripedium candidum*. *Annals of Botany*, London, v. 75, p. 267-275
- Pereira MC, Torres DP, Guimarães FAR, Pereira OL, Kasuya MCM (2011) Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. *Acta Bot. Bras.* [online], vol.25, n.3, pp. 534-541
- Pierik RLM, Sprenkels PA, Van der Harst B, and Q. G. Van der Meys QG (1988) Seed germination and further development of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. *Sci. Hort.* 34:139–153.
- Pierik RLM (1990) Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Mundi Prensa
- Pinheiro F, Barros F (2007) *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. *Hoehnea* 34(4), pp.563-570
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW (1999) *Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Oxford University Press, Oxford.

- Ramsay MM, Jackson AD, Porley RD (2000) A pilot study for the ex situ conservation of UK bryophytes. In: BGCI, ed. EuroGard 2000 – II European Botanic Gardens Congress. Canary Islands, Spain: Las Palmas de Gran Canaria; 2000:52–57
- Rasmussen FN (1985) Orchids. Pp. 249-274. In: R.M.T. Dahlgren; H.T. Clifford & P.F. Yeo (eds.). The families of the Monocotyledons. Berlin, Springer-Verlag
- Rasmussen HN (1995) Terrestrial orchids from seed to Mycotrophic Plant. Cambridge University Press, Cambridge
- Sarasan VA, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 42, 206–214
- Seaton PT, Ramsay M (2005) Growing orchids from seed. Royal Botanic Gardens, Kew
- Sathyanarayana BN, Varghese DB (2007) Plant tissue culture: practices and new experimental protocols. Nova Deli, Índia: I K International Publishing House
- Stancato GC, Chagas EP, Mazzafera P (1998) Development and germination of seeds of *Laelia purpurata* (Orchidaceae). *Lindleyana* 13: 97–100
- Stancik JF, Goldenberg R, Barros F de (2009) O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta bot. bras.* 23(3): 864-880
- Swarts ND, Dixon KW (2009) Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, v. 14, p. 590–598
- Vogel IN, Macedo AF (2010) Influence of IAA, TDZ and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult*
- Yamazaki J, Miyoshi K (2006) *In vitro* germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, v. 98

Capítulo II
***Bulbophyllum peri*: dormência, viabilidade de sementes**
e germinação *in vitro*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo de germinação e crescimento *in vitro* de plântulas da espécie *Bulbophyllum peri*, testando diferentes meios de cultura e tempos de armazenamento em banco de sementes. Sementes sem armazenamento de *B. peri* inoculadas nos meios de cultura MS, MS/2, WPM e Knudson C, apresentaram germinação máxima de 7% no meio WPM. No entanto, quando tratadas com pré-resfriamento de 8°C por 21 dias, a porcentagem foi de 40% também no meio WPM. Isto indicou a ocorrência de dormência fisiológica nestas sementes, e a temperatura mais baixa promoveu efeito benéfico na germinação. As sementes foram armazenadas a -20°C por quatro, oito e doze meses, sendo que as maiores porcentagens de germinação foram obtidas no meio MS (57,9%) e no WPM (56,5%), após quatro meses de armazenamento. O índice de velocidade de germinação e o índice de crescimento também foram melhores, após quatro meses de armazenamento. Após oito e doze meses de armazenamento houve redução significativa na germinação de sementes cultivadas nos meios de cultura MS e MS/2. Após 90 dias, todas as plântulas foram transferidas para meio WPM para continuar o crescimento. Na fase de aclimatização, a porcentagem de sobrevivência foi mais alta (35%) no substrato Plantmax florestal® e vermiculita (1:2). A germinação assimbiótica de *B. peri* deve ser realizada em meio de cultura WPM, após tratamento de pré-resfriamento para auxiliar na superação da dormência. O armazenamento das sementes a -20° C pode ser realizado por até doze meses, desde que as sementes sejam germinadas em meio WPM.

Palavras-chave: Orchidaceae; pré-resfriamento; banco de sementes; meios de cultura.

ABSTRACT

The aim of this study was to establish a protocol for in vitro germination and growth of the species *Bulbophyllum peri*, testing different media and different storage times in the seed bank. Fresh seeds of *B. peri* inoculated in the culture media MS, MS/2, WPM and Knudson C showed maximum germination of 7% in the WPM. However, when treated with pre-chilling of 8°C for 21 days, the percentage was 40% also in WPM. This indicates the occurrence of physiological dormancy in these seeds, and lower temperature promotes beneficial effect on germination. Moreover, when stored for longer (four, eight and twelve months) at low temperature (-20°C), after four months of storage were recorded the highest germination of 57.9% in MS medium and 56.5% in the WPM. In this same period the rate of velocity germination index and growth index were also better. After eight and twelve months of storage there was a significant decrease in germination media for MS and MS/2. After 90 days, all seedlings were transferred to WPM medium to continue growth. In the acclimatization stage, the survival percentage was higher in Plantmax florestal® and vermiculite (1:2), with about 35%. The assymbiotic germination of *B. peri* should be carried out in WPM, after a pre-chilling treatment to help break dormancy. The seed storage at -20°C can be accomplished until twelve months. But the germination must be in WPM.

Key-words: Orchidaceae; pre-chilling; seed bank; culture media.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Bulbophyllum* Thouars (Dendrobieae, Bulbophyllinae) é um dos maiores gêneros de Orchidaceae, com aproximadamente 1.200 espécies (Dressler 1993). *B. peri* é uma espécie endêmica do Brasil que ocorre na Mata Atlântica e Cerrado, normalmente como epífita (Smidt et al. 2011) e nenhum estudo sobre sua germinação *in vitro* foi realizado até momento.

Muitas espécies de orquídea têm sido cultivadas *in vitro* a partir de sementes, desde que Lewis Knudson, em 1922, descobriu que as sementes de algumas orquídeas podiam germinar assimbioticamente em meio de cultura (Pierik 1988). No ambiente *ex vitro* a propagação das orquídeas é dificultada pela baixa porcentagem de germinação, requerimento de associação simbiótica com fungos micorrízicos e crescimento lento das plantas (Rasmussen 1995).

As ameaças ao futuro de muitas espécies de orquídeas na natureza implicam na urgência de programas de banco de sementes e pesquisas para suprir a falta de informação a respeito da fisiologia de sementes armazenadas e o consequente desenvolvimento de estratégias efetivas para a conservação *ex situ* (Swarts e Dixon 2009). É importante prever o efeito do ambiente na longevidade das sementes, como a lenta perda de viabilidade no armazenamento de sementes à longo prazo para conservação genética (Ellis e Roberts, 1980).

Para requerimentos comerciais e de conservação de espécies, é desejável que se estabeleçam métodos de cultivo *in vitro* para a propagação rápida e em larga escala. A germinação *in vitro* permite a produção de grande quantidade de plântulas em curto espaço de tempo (Pedroza-Manrique e Mican-Gutiérrez 2006). Aliada a esta prática, bancos de armazenamento de material vegetal, como por exemplo de sementes, mantidas em baixas temperaturas, é uma maneira segura e de alto custo-benefício para o armazenamento à longo prazo de material genético (Sarasan et al. 2006).

De acordo com Johnson et al. (2011), nutrientes do meio de cultura, carboidratos e até componentes orgânicos têm grande influencia na cultura assimbiótica, sendo que esses fatores vem sendo estudados por vários autores (Lo

et al. 2004; Yamazaki e Miyoshi 2006; Dutra et al. 2008; Dutra et al. 2009; Hossain et al. 2009; Ávila-Díaz et al. 2009; Vogel e Macedo 2010).

A cultura assimbiótica permite a manipulação e estudo de efeitos específicos de compostos e condições ambientais na germinação e desenvolvimento das plântulas (Johnson e Kane 2011). O efeito da temperatura em diferentes tipos de dormência seja fisiológica (regulada por condições ambientais) ou física (barreiras físicas na testa da semente) é encontrado especialmente em orquídeas terrestres (Rasmussen 1992; Oien et al. 2008), porém pouco se sabe sobre o assunto em orquídeas epífitas. De acordo com Johnson e Kane (2011) o pré-resfriamento de sementes tem sido estudado e indica que a germinação de orquídeas é parcialmente regulada por dormência fisiológica. A dormência em sementes de orquídeas é uma característica evolutivamente importante, uma vez que a quantidade de reservas é mínima, ou seja, suficiente apenas para manter o nível basal de respiração até o seu contato com o micossimbionte (Hadley, 1982). Assim, a dormência atua para proteger e promover maiores chances de germinação (Johnson e Kane 2011).

O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo de germinação e crescimento *in vitro* da espécie *Bulbophyllum peri*, testando diferentes meios de cultura e tempos de armazenamento em banco de sementes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POLINIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

O processo de polinização manual de *Bulbophyllum peri* foi realizado em março de 2010 no Parque Estadual do Canyon Guartelá (Tibagi – PR). Após 65 a 70 dias da polinização, as cápsulas de *B. peri* estavam maduras. As mesmas foram coletadas e levadas ao laboratório para suas sementes passarem pelo processo de secagem, armazenamento no banco de sementes e germinação *in vitro*.

O protocolo de secagem e armazenamento de sementes seguiu as indicações de Seaton e Ramsay (2005). As cápsulas foram lavadas com água corrente e sabão, sendo o fruto cortado no sentido longitudinal, raspando as sementes sobre uma

placa de Petri. A placa foi colocada em dessecador de vidro, contendo solução saturada de cloreto de cálcio (CaCl_2) Em temperatura ambiente por sete dias. As sementes foram transferidas para pequenos frascos de vidro, etiquetados e armazenados em frascos de vidro maiores, juntamente com sílica laranja, usada como indicador de umidade dentro do frasco. Após este processo, as sementes foram armazenadas a -20°C , para testes posteriores de viabilidade aos 4, 8 e 12 meses de armazenamento. Sementes recém colhidas também tiveram sua viabilidade testada por meio de germinação *in vitro*.

2.2 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO E DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E FORMAÇÃO DE PROTOCORMOS

As sementes foram desinfestadas em solução de 0,75% de hipoclorito de sódio (NaOCl), acrescido de 0,1% de Tween 20® por dez minutos. Em seguida foram realizadas quatro lavagens com água destilada autoclavada. Posteriormente, as sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo 40 ml dos meios de cultura: MS, MS/2, WPM e KC. Os meios MS, MS/2 (com metade da concentração de sais) e WPM foram suplementados com 100 mg.L^{-1} de inositol, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de piridoxina HCl e 2 mg.L^{-1} de glicina. A tiamina foi adicionada na concentração $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ nos meios MS e MS/2 e 1 mg.L^{-1} no WPM. O meio KC não foi suplementado com vitaminas e inositol (Anexo 1). As composições iônicas dos meios de cultura podem ser vistas no anexo 2.

As placas com as sementes foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante o dia e $18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante a noite, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de $40 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Avaliações foram realizadas aos 25, 35, 45 e 60 dias após inoculação das sementes nos meios de cultura, considerando-se as seguintes variáveis: porcentagem de germinação; fases de desenvolvimento dos protocormos classificadas em: (1) semente viável (inchada com testa), (2) germinação (inchada com testa rompida), (3) protocormo com rizóides, (4) protocormo com rizóides e ápice caulinar, (5) plântula com uma folha e (6) plântula com a folha alongada; índice de crescimento (IC), adaptado de Otero et al. (2004; 2005), por meio da fórmula:

$$IC = \frac{N_1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4 + N_5 \times 5 + N_6 \times 6}{N_1 + N_2 + N_3 + N_4 + N_5 + N_6}$$

na qual N_1 é o número de sementes no estágio 1, N_2 é o número de sementes no estágio 2, etc. (sendo que este cálculo não foi realizado para sementes sem armazenamento); índice de velocidade de germinação (IVG) criado por Maguire (1962) e simplificado por Hosomi et al. (2011):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} + \frac{G_4}{N_4}$$

na qual de G_1 a G_4 é a quantidade de sementes germinadas em cada período de contagem e de N_1 a N_4 é a quantidade de dias em cada período de contagem.

2.3 EFEITO DO TRATAMENTO DE PRÉ-RESFRIAMENTO NA GERMINAÇÃO

Após testes iniciais nos quais sementes recém colhidas não germinaram ou germinaram pouco, novas sementes foram coletadas no Parque Estadual do Canyon Guartelá (Tibagi – PR) em maio de 2011 e parte destas foram colocadas por 21 dias em refrigerador ($8^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). As sementes sem e com pré-resfriamento foram inoculadas nos mesmos meios de cultura citados anteriormente e mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições. As avaliações de porcentagem de germinação foram realizadas aos 60 dias de cultivo e os cálculos de IVG foram realizados utilizando os dados de 25, 35, 45 e 60 dias de cultivo.

2.4 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO

Plântulas apresentando uma folha com 0,2 cm a 0,4 de comprimento foram transferidas para meio de cultura WPM, sem regulador vegetal para indução do alongamento e enraizamento. Subcultivos para o mesmo meio foram realizados a cada 60 dias, totalizando cinco subcultivos.

Plantas com uma folha e pseudobulbo formado foram transplantadas em bandejas de semeadura contendo diferentes substratos: Plantmax florestal® e vermiculita (PV; 1:2), sphagnum e fibra de coco (SF; 2:1) e carvão e fibra de coco (CF; 2:1). Inicialmente as plantas aclimatizadas foram mantidas sob plástico transparente e tela de sombrite 50% para manter a umidade e evitar o excesso de luminosidade. Após 10 dias o plástico foi retirado e o sombrite foi mantido até o final do experimento. A temperatura média da casa de vegetação entre 15 de setembro e 15 de dezembro, foi de 24,2°C ao meio dia, variando ao longo do dia entre 11 e 30,5°C. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada após 90 dias.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para todos os experimentos. Para a germinação foram realizadas cinco repetições, sendo duas placas por repetição com 100 sementes avaliadas por placa, tendo o meio de cultura e tempo de armazenamento arranjado fatorialmente (4x4). O experimento de aclimatização consistiu de oito repetições com cinco explantes cada. Os resultados foram, então, submetidos à análise estatística descritiva e comparação de médias pelo Teste de Tukey 5% de probabilidade. A análise dos dados foi realizada pelo programa Sisvar® (Ferreira, 2000).

3. RESULTADOS

3.1 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO, DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E FORMAÇÃO DE PROTOCORMOS

As sementes de *Bulbophyllum peri* utilizadas para a germinação *in vitro* indicaram que há efeito significativo ($P \leq 0,05$) da interação dos meios de cultura com o tempo de armazenamento em banco de sementes a -20°C.

As sementes sem armazenamento colocadas para germinar apresentaram baixas porcentagens de germinação (abaixo de 7%) em todos os meios de cultura testados (tabela 1). Porém, após quatro meses de armazenamento, a porcentagem de germinação aumentou, chegando a 57,9 e 56,5% nos meios MS e WPM, respectivamente. Para os meios MS, MS/2 e WPM a maior porcentagem de germinação foi aos quatro meses, porém para os meios KC e WPM, não houve diferença significativa em relação aos oito e 12 meses de armazenamento. Em contrapartida, os meios MS e MS/2 apresentaram porcentagens de germinação significativamente mais baixas aos oito e 12 meses de armazenamento, porém ainda mais altas que sementes sem armazenamento (Tabela 1).

Tabela 1. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Bulbophyllum peri*, SEM ARMAZENAMENTO E ARMAZENADAS A -20°C, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO.

Meio	Germinação (%)			
	Sem armazenamento	4 meses armazenamento	8 meses armazenamento	12 meses armazenamento
KC	0,0 aB	17,2 cA	20,0 cA	15,2 cA
MS	3,8 aC	57,9 aA	38,2 bB	36,6 bB
MS/2	3,4 aC	39,9 bA	25,6 cB	24,2 cB
WPM	7,0 aB	56,5 aA	53,4 aA	51,6 aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

O índice de velocidade de germinação teve interação significativa entre os fatores testados, de meio de cultura e tempo de armazenamento ($p \leq 0,05$). Os índices mais altos foram obtidos no meio WPM após quatro, oito e doze meses (tabela 2). O meio MS obteve alto IVG aos quatro meses, porém houve uma queda significativa aos oito e doze meses, e após esses períodos de armazenamento também o IVG obtido foi significativamente inferior ao do meio WPM. Os menores índices foram registrados para o meio MS/2 e KC (tabela 2).

Tabela 2. ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *B. peri* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO.

Meio	IVG			
	0	4	8	12
KC	0,00 a C*	1,59 c A	1,19 b AB	0,86 c B
MS	0,20 a C	4,39 a A	1,80 b B	1,58 b B
MS2	0,18 a C	2,97 b A	1,28 b B	1,28 bc B
WPM	0,36 a C	4,29 a A	2,60 a B	2,29 a B

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

O índice de crescimento indica o crescimento desde a germinação das sementes até a fase de plântula. Seis fases foram determinadas para o crescimento de *B. peri*, sendo excluído o resultado dos testes de sementes sem armazenamento devido a baixa porcentagem de germinação. As sementes cultivadas no meio KC apresentaram baixa germinação, e também ao longo do tempo de cultivo, não passaram para fases posteriores de desenvolvimento, mantendo o IC sempre próximo de 1 (tabela 3). Além disso, neste meio, as sementes germinadas não adquiriram coloração esverdeada como nos outros meios de cultura. Para os meios MS, MS/2 e WPM o padrão de crescimento foi o mesmo, sempre com índices maiores aos 60 dias de cultivo e após quatro meses de armazenamento. Houve redução significativa dos índices de crescimento após oito e doze meses de armazenamento ($p \leq 0,05$). As plântulas dos meios MS, MS/2 e WPM atingiram o estágio 5 (plântula com uma folha), após 60 dias de cultivo.

Tabela 3. ÍNDICE DE CRESCIMENTO DE PROTOCORMOS DE *B. peri* CULTIVADOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E DIAS DE CULTIVO EM SEMENTES ARMAZENADAS A -20°C

Dias de cultivo	Armazenamento (meses)	Meio			
		KC	MS	MS/2	WPM
25	4	1,14 ab B	1,34 d A	1,19 efg B	1,26 e AB
25	8	1,07 ab A	1,06 f A	1,03 g A	1,07 f A
25	12	1,04 b A	1,04 f A	1,03 g A	1,05 f A
35	4	1,17 ab C	1,63 c A	1,50 bc B	1,70 c A
35	8	1,11 ab B	1,22 de AB	1,17 efg AB	1,27 e A
35	12	1,11 ab B	1,17 ef AB	1,15 fg AB	1,23 e A
45	4	1,20 a C	1,81 b A	1,56 b B	1,91 b A
45	8	1,16 ab C	1,35 d B	1,30 def B	1,60 cd A
45	12	1,19 ab C	1,33 de B	1,31 de B	1,46 d A
60	4	1,20 a C	2,91 a A	2,82 a A	2,70 a B
60	8	1,23 a D	1,60 c B	1,42 bcd C	1,99 b A
60	12	1,22 a D	1,58 c B	1,40 cd C	1,92 b A
Média geral		1,15	1,5	1,41	1,6

Letras minúsculas iguais na coluna e letras maiúsculas iguais na linha não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

3.2 EFEITO DO PRÉ-RESFRIAMENTO NA GERMINAÇÃO

A interação entre meios de cultura e temperatura prévia à germinação foi significativa ($p \leq 0,05$). No meio KC, porém, os resultados foram os mesmos, não houve germinação nas sementes sem armazenamento e nas mantidas a 8°C por 21 dias (tabela 4). Em relação aos outros meios de cultura, as porcentagens de

germinação aumentaram com três semanas em temperatura de 8°C, apesar de serem mais baixas dos que às obtidas após quatro meses de armazenamento. O melhor resultado foi obtido para o meio WPM, com 40% de germinação (tabela 4).

Em relação à análise de índice de velocidade de germinação, o índice também foi muito baixo para sementes sem armazenamento. Para as sementes mantidas por alguns dias a temperatura mais baixa (8°C por 21 dias), a velocidade de germinação foi maior, assim como, a porcentagem de germinação. Os resultados variaram bastante entre os meios de cultura, apresentando o melhor índice nas sementes inoculadas no meio WPM.

Tabela 4 . PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Bulbophyllum peri*, SEM ARMAZENAMENTO E MANTIDAS POR 21 DIAS À 8°C, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA APÓS 60 DIAS DE CULTIVO

Meio	Germinação (%)		IVG	
	Sem armazenamento	Mantidas a 8°C	Sem armazenamento	Mantidas a 8°C
KC	0,0 bA	0,0 dA	0,00 bA	0,00 dA
MS	3,8 abB	29,0 bA	0,20 aB	1,36 bA
MS/2	3,4 abB	21,0 cA	0,18 abB	0,92 cA
WPM	7,0 aB	40,0 aA	0,36 aB	1,92 aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferiram significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3 ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO

Durante os primeiros noventa dias já foram observadas raízes, sendo formadas em todos os meios de cultura, exceto no KC, não havendo necessidade de adição de regulador vegetal para indução do enraizamento. Sementes germinadas no meio KC, quando transferidas após 90 dias de cultivo para o meio WPM, continuaram o crescimento normal até atingir a fase 6 de crescimento (plântula com uma folha alongada). Foram realizados subcultivos para o meio WPM a cada 60 dias, sendo que ao final do segundo subcultivo, aos 120 dias, 100% da plantas estavam enraizadas no meio de cultura WPM.

Após doze meses, as plantas aclimatizadas tiveram baixas porcentagens de sobrevivência nos três substratos testados. A sobrevivência das plantas no substrato fibra de coco e carvão e sphagnum e fibra de coco foram significativamente menores

do que o substrato Plantmax florestal® e vermiculita ($p \leq 0,05$; fig 1), assim como sphagnum e fibra de coco apresentaram porcentagem menor que Plantmax florestal® e vermiculita.

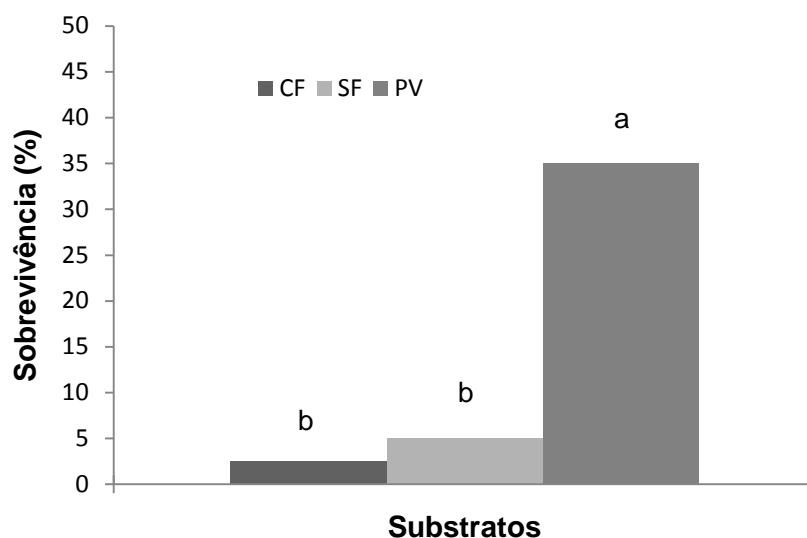


Fig 1. PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *B. peri* APÓS 90 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO EM DIFERENTES SUBSTRATOS, APOS 12 MESES DE CULTIVO *in vitro*. Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferiram pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). PV = Plantmax florestal® + vermiculita (1:2); SF = sphagnum + fibra de coco (2:1); CF = carvão + fibra de coco (2:1).

4. DISCUSSÃO

Os resultados de germinação de *B. peri* confirmaram que o meio de cultura é um fator determinante para o sucesso do cultivo *in vitro* de orquídeas, como foi relatado por Araújo *et al.* (2009). O melhor meio de cultura para a germinação de sementes e desenvolvimento das plântulas foi o WPM, com porcentagens de germinação satisfatórias (aproximadamente 50%) após os períodos de armazenamento de quatro até 12 meses a -20°C . As sementes cultivadas em meio MS também apresentaram germinação satisfatória após quatro meses de armazenamento ocorrendo redução após oito e doze meses de armazenamento. O meio WPM quando comparado ao meio MS possui a concentração iônica total mais baixa. De acordo com Rasmussen (1995), as orquídeas geralmente se desenvolvem em ambientes com baixas concentrações de nutrientes, o que explica a preferência

de *B. peri* por WPM, assim como Araújo et al. (2009) constataram que o mesmo meio foi melhor para o crescimento de plântulas de *Cattleya loddigesii*. As altas concentrações de certos nutrientes como nitrogênio e potássio, podem ser tóxicas a estas plantas. Além disso, o meio WPM, que foi originalmente desenvolvido para espécies lenhosas, tem sido cada vez mais utilizado na micropropagação de plantas ornamentais em laboratórios comerciais (Sathyanarayana e Varghese 2007).

Os resultados indicaram que o meio KC foi o menos adequado à germinação de *B. peri*. De acordo com Pierik et al. (1988), o meio KC tem sido a base para a formulação de outros meios para a germinação de orquídeas. Porém, segundo Nardarajan et al. (2011), o meio KC também proporcionou baixas porcentagens de germinação para as espécies epífitas *Cattleya maxima*, *Encyclia chloroleuca* e *Jumellea sagittata*, com cerca de 10, 5 e 1%, respectivamente. Isto pode ser devido à razão do amônio e nitrato ser determinante no crescimento *in vitro*, sendo que o amônio deve ser no máximo 1/3 da concentração total (Araújo et al. 2009). Nos meios de cultura testados neste estudo, os meios MS, MS/2 e WPM, apresentam uma razão aproximada de 1:2, enquanto o meio KC apresenta razão de praticamente 1:1. Esta razão de amônio e nitrato do meio KC pode ter influenciado negativamente os resultados das orquídeas epífitas como *C. máxima*, *Encyclia chloroleuca* e *Jumellea sagittata* (Nardarajan et al. 2011) e *C. loddigesii* (Araújo et al. 2009), assim como também influenciou negativamente o crescimento de *B. peri*.

As sementes sem armazenamento de *B. peri* apresentaram baixa porcentagem de germinação (7%), porém quando tratadas com temperaturas mais baixas (8°C) durante 21 dias, antes da inoculação *in vitro*, os resultados foram positivos. Desta maneira constatou-se que as sementes apresentaram dormência necessitando de um tratamento prévio de estratificação para aumentar a porcentagem de germinação para 40%. Resultados semelhantes foram obtidos por Shimura e Koda (2004), os quais utilizaram a temperatura de 4°C, com as sementes mantidas no escuro, por três meses para aumentar quatro vezes a porcentagem de germinação de *Cypripedium macranthos* var. *rebunense*, quando comparada com a obtida em sementes sem o pré-tratamento.

B. peri e *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* parecem compartilhar do mesmo tipo de dormência, a fisiológica que está ligada a uma adaptação ecológica. Elas produzem suas sementes no outono, porém não devem germinar até a próxima primavera. Desta maneira, a dormência serve de proteção contra danos que possam

ser causados durante o inverno (Lauzer et al. 2007). Isto explica, também, o fato de temperaturas baixas em laboratório influenciarem os resultados positivos na germinação *in vitro*. Apesar de Orchidaceae ser a maior família botânica, pouco se sabe sobre o papel que as temperaturas das estações do ano têm na regulação da germinação (Johnson e Kane 2011). Mais estudos relacionados aos diferentes tempos de pré-resfriamento e temperaturas frias devem ser realizados para aumentar a germinação de *B. peri*, sendo que a germinação máxima obtida foi de 57,9%, porém superior à germinação obtida para outras espécies com o mesmo tipo de dormência (Lauzer et al. 2007; Shimura e Koda 2004).

O armazenamento por quatro meses a -20°C teve efeito positivo para as sementes de *B. peri*. Os melhores resultados obtidos após quatro meses de armazenamento corroboram com a teoria de dormência desta espécie. O armazenamento tende a diminuir a viabilidade de sementes (sem dormência), o que ocorreu nos resultados obtidos após oito e doze meses de armazenamento nos meios MS e MS/2. Resultado semelhante foi obtido por Hosomi et al. (2011), com sementes de *Cattleya*, submetidas a condições semelhantes de armazenamento. A porcentagem de germinação aumentou após o armazenamento para as espécies *C. granulosa* (de 86 para 98%), *C. mossiae* (de 48 para 68%) e *C. tenuis* (de 59 para 73%).

O aumento na germinação pode ser explicado pela superação de dormência. Por outro lado, a diminuição na germinação pode ocorrer devido a problemas como envelhecimento e degradação das sementes. A pouca quantidade de reserva das sementes de orquídea consiste basicamente de ácidos graxos (Stancato et al. 1998) e estes compostos estão sujeitos a peroxidação, processo baseado na ação nociva de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são geradas pela respiração (Machado Neto e Custódio 2005). De acordo com Bailly (2004), o acúmulo de EROs leva a danos celulares e distúrbios no desenvolvimento ou no processo de germinação. Segundo Machado Neto e Custódio (2005), sementes armazenadas em condições que não são ideais podem estar sujeitas a este processo e perder a viabilidade.

O índice de velocidade de germinação foi muito baixo para sementes sem armazenamento e maior para as sementes armazenadas por quatro meses, seguida de um pequeno atraso na germinação após oito e doze meses de armazenamento. Hosomi et al (2011) obtiveram resultados semelhantes a estes em cinco espécies de *Cattleya* após três meses de armazenamento a -18°C. Os autores observaram a

diminuição no IVG como indicativo negativo para o armazenamento à longo prazo, indicando com isso que a qualidade fisiológica da semente estava diminuindo.

Adaptando o cálculo de Otero et al. (2004) à cultura assimbiótica de *B. peri*, grandes diferenças no IC foram observadas nos meios de cultura, sendo que no meio KC poucas sementes passaram da fase 1 (semente viável - inchada com testa). O melhor resultado foi observado no meio WPM atingindo índice de crescimento de 2,8 aos 60 dias de cultivo, indicando que a maioria dos explantes avaliados estavam na fase três. Não somente o decréscimo nos valores de IVG deve ser considerado como um dos primeiros passos no processo de deterioração da semente e diminuição da viabilidade, como também o mesmo conceito pode e deve ser aplicado ao IC, sendo o seu decréscimo indicativo de atraso no crescimento das plântulas e menor vigor. Otero et al. (2004) desenvolveram o cálculo para o índice de crescimento para demonstrar a evolução no crescimento das plantas em meio de cultura simbiótico entre a orquídea *Tolumnia variegata* e isolados de duas espécies de fungos. Eles encontraram grandes diferenças na resposta com diferentes isolados e também com relação ao controle sem fungo.

Após o crescimento *in vitro*, as plantas foram aclimatizadas em substratos de composição diferente, sendo o melhor resultado (35%) obtido no substrato Plantmax florestal® e vermiculita, que é formado por partículas menores. Da mesma maneira, Moraes et al. (2002) constataram que para a orquídea epífita *Dendrobium nobile* o substrato plantmax + vermiculita (1:2) foi o melhor para a aclimatização e crescimento das plantas em substituição ao xaxim, com 87% de sobrevivência. Cada vez mais substratos alternativos ao xaxim e sphagnum têm sido testados, a fim de utilizar compostos que não agriçam nem causem transtornos à natureza. Porém, como há grande diversidade de espécies, habitats e requerimentos, o tipo de substrato deve ser adequado para cada espécie. No presente estudo a porcentagem de sobrevivência foi baixa (35%), sendo necessários mais estudos para que a técnica seja aprimorada. Uma provável explicação para a baixa sobrevivência é a morfologia da planta de *B. peri*, que apresenta apenas uma folha por pseudobulbo, estando facilmente sujeita à desidratação.

5. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que o melhor meio de cultura para a germinação de *B. peri* é o WPM, promovendo maior porcentagem de germinação, além de sua composição nutricional ser ideal para garantir crescimento mais rápido e vigoroso das plântulas. O armazenamento a -20°C pode ser realizado até doze meses, desde que a germinação seja realizada em meio WPM. No entanto, como foi observada dormência nas sementes sem armazenamento, tratamentos de pré-resfriamento ajudam na superação da mesma. Porém, novos tratamentos com temperaturas e períodos diferentes devem ser testados para que porcentagens mais altas de germinação possam ser obtidas. Além disso, devido à sua morfologia de apenas uma folha por pseudobulbo, a metodologia de aclimatização também deve ser melhorada.

6. REFERÊNCIAS

- Ávila-Díaz I, Oyama K, Gomez-Alonso C, Salgado-Garciglia R (2009) *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 99, n. 3.
- Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research, v.14, p. 93-107.
- Dressler RL (1993) Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland, OR.
- Dutra D, Johnson TR, Kauth PJ, Stewart SL, Kane ME, Richardson L (2008) Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. Plant Cell Tiss Organ Cult, v. 94.
- Dutra D, Kane ME, Richardson L (2009) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. Plant Cell Tiss Organ Cult, n. 96.
- Ellis RH, Roberts EH (1980), Improved equations for the prediction of seed longevity, Annals of Botany 45, 13-30

- Hadley G (1982) Orchid mycorrhiza. In: Arditti J. (Ed), *Orchid Biology – Reviews and Perspectives II*. Ithaca: Cornell University Press, p.84-118.
- Hossain MM, Sharma M, Pathak P (2009) Cost effective protocol for *in vitro* mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. – a medicinally important orchid. *Eng. Life Sci.*, v. 9, n. 6.
- Johnson TR, Kane ME (2011) Effects of temperature and light on germination and early seedling development of the pine pink orchid (*Bletia purpurea*). *Plant Species Biology*. doi: 10.1111/j.1442-1984.2011.00347.x
- Johnson TR, Kane ME, Pérez HE (2011) Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). *Plant Growth Regul* (2011) 63:89–99
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 14: 214- 217
- Lauzer D, Renaut S, St-Arnaud M, Barabe D (2007) *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr. (Orchidaceae). *J. Torrey Bot. Soc.* 134: 344–348.
- Lloyd G, Mccown B (1980) Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience*, Alexandria, v. 15, p. 416
- Lo SF, Nalawade SM, Kuo CL, Chen CL, Tsay HS (2004) Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino – a medicinally important orchid. *In vitro Cell. Biol. – Plant*, v. 40
- Machado-Neto NB, Custódio CC (2005) Orchid Conservation through seed banking: ins and outs. *Selbyana*, v. 26, n. 1.
- Moraes LM, Cavalcante LCD, Faria R T (2002) Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.24, n.5, p.1397-1400
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497.
- Øien DI, O'Neill JP, Whigham DF, McCormick MK (2008) Germination ecology of the boreal-alpine terrestrial orchid *Dactylorhiza lapponica* (Orchidaceae). *Ann Bot Fenn* 45: 161–172
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2004) Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Mol. Ecol.* 13, 2393–2404

Otero JT, Bayman P, Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. *Evolutionary Ecology* 19:29–43

Pierik RLM, Sprenkels PA, Van der Harst B, and Q. G. Van der Meys QG (1988) Seed germination and further development of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. *Sci. Hort.* 34:139–153.

Rasmussen HN (1995) *Terrestrial orchids from seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge

Sarasan VA, Cripps R, Ransay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 42, 206–214

Seaton PT, Ramsay M (2005) *Growing orchids from seed*. Royal Botanic Gardens, Kew

Shimura H, Koda Y (2004) Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 273–276, 2004.

Smidt EC, Borbo EL, Gravendeel B, Fischer GA, van den Berg C (2011) Molecular phylogeny of the Neotropical sections of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) using nuclear and plastid spacers. *TAXON* 60 (4) 1050–1064.

Stancato GC, Chagas EP, Mazzafera P (1998) Development and germination of seeds of *Laelia purpurata* (Orchidaceae). *Lindleyana* 13: 97–100

Stancik JF, Goldenberg R, Barros F de (2009) O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta bot. bras.* 23(3): 864-880

Sathyanarayana BN, Varghese DB (2007) *Plant tissue culture: practices and new experimental protocols*. Nova Deli, Índia: I K International Publishing House

Swarts ND, Dixon KW (2009) Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, v. 14, p. 590–598

Vogel IN, Macedo AF (2010) Influence of IAA, TDZ and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult*

Yamazaki J, Miyoshi K (2006) *In vitro* germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, v. 98

Capítulo III

Indução de estruturas semelhantes à protocormos a partir de folhas e protocormos de *Bulbophyllum peri* e *Epidendrum secundum*

RESUMO

Um processo eficiente de regeneração de estruturas semelhantes à protocormos de *Bulbophyllum peri* e *Epidendrum secundum* foi descrito utilizando folhas e protocormos de sementes germinadas *in vitro*. Folhas de plantas de três e oito meses e protocormos de três meses sem o ápice foliar de *B. peri* e folhas de dois e seis meses e protocormos sem o ápice foliar de dois meses de *E. secundum*, obtidos da germinação *in vitro*, foram utilizados como explantes. Os mesmos foram inoculados em meio de cultura WPM com várias concentrações de BAP (1 a 40 μ M), em regime de luz (fotoperíodo de 16 horas) ou escuro seguido de luz (fotoperíodo de 16 h). Independente da idade, as folhas responderam menos aos tratamentos quando comparadas com os protocormos. Estes alcançaram níveis de indução de ESPs (estruturas semelhantes a protocormos) próximos de 100% em *B. peri* quando tratados primeiramente no escuro, seguido de fotoperíodo de 16 horas, e de 100% em *E. secundum* independente da presença ou ausência de luz. Análises histológicas demonstraram que em ambos os tipos de explantes, folhas e protocormos, os ESPs são originados a partir de sucessivas divisões das células epidérmicas. Após formação de ESPs, os explantes foram individualizados e transferidos para meio WPM sem regulador, para o desenvolvimento das plântulas *in vitro*. Os resultados indicaram que para a regeneração de ESPs em explantes das duas espécies é necessária a adição de BAP ao meio de cultura, na concentração de 1 μ M para *E. secundum* e para *B. peri* varia de acordo com o explante, de 5 μ M para folhas e 20 μ M para protocormos, sendo que os protocormos sem o ápice foliar foram os explantes mais responsivos.

Palavras-chave: Orchidaceae, propagação *in vitro*, micropropagação.

ABSTRACT

An efficient process for regeneration of protocorm-like bodies of *Bulbophyllum peri* and *Epidendrum secundum* was described using protocorms and leaves of *in vitro* grown plants. Leaves with three and eight months and three months protocorms with timmed apex leaf of *B. peri* and leaves with two and six months and two months protocorms with timmed apex leaf of *E. secundum*, from *in vitro* germinated seeds, were inoculated in WPM medium with various concentrations of BAP (1 to 40 μM) under 16 hours photoperiod or under darkness followed by 16 hour photoperiod. Regardless of age, the leaves were less responsive than the protocorms. Protocorms reached high levels of PLBs induction, almost 100% of responsive explants for *B. peri*, when treated in the dark, and 100% for *E. secundum*, without interference of the presence or absence of light. Histological analysis demonstrated that in both types of explants, leaves and protocorms, PLBs were formed from successive divisions of epidermal cells. After PLBs formation, they were individualized and transferred to WPM medium without any growth regulators and successfully formed new *in vitro* seedlings. The results indicated that for regeneration of PLBs in explants of both species it's necessary to add BAP to the medium, at 1 μM to *E. secundum* and to *B. peri* varies according to the explants, 5 μM for leaves and 20 μM for protocorms, the protocorms with timmed apex leaf were the most suitable for regeneration.

Key-words: Orchidaceae, *in vitro* propagation, micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

Bulbophyllum Thouars (Dendrobieae, Bulbophyllinae) é um dos maiores gêneros de Orchidaceae, com aproximadamente 1.200 espécies (Dressler 1993). *B. peri* é uma espécie endêmica do Brasil que ocorre na Mata Atlântica e Cerrado, normalmente como epífita e muito pouco se sabe sobre esta espécie (Smidt et al. 2011). O gênero *Epidendrum* L. apresenta cerca de 1000 espécies que se distribuem desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (Rasmussen 1985). De acordo com Stancik et al. (2009), a espécie *E. secundum* Jacq. ocorre no estado do Paraná como epífita, terrestre ou rupícola e floresce o ano todo.

A propagação vegetal convencional para orquídeas é dificultada pela demora no crescimento das plantas e não promove produção de clones suficientes em curto espaço de tempo (Martin e Madassery 2006). As técnicas de cultura de tecidos têm sido largamente utilizadas com sucesso para a propagação de diferentes espécies de orquídeas terrestres e epífitas (Díaz e Álvarez 2009). A utilização de diferentes explantes, como meristema apical, folha, caule, pedúnculo floral, inflorescência, segmento de raiz e rizoma também tem sido cada vez mais divulgada (Chugh et al. 2009). Pois, apesar de bastante difundida, a germinação *in vitro* não permite a clonagem do material, ou seja, não há uniformidade nas plantas formadas.

O termo estruturas semelhantes à protocormos (ESPs), foi utilizado pela primeira vez por Morel (1960 citado por Silva e Tanaka 2006) para descrever estas estruturas que se parecem com os protocormos, porém são formados por tecidos de outros explantes ou calos *in vitro*. A formação de protocormos a partir de sementes germinadas *in vitro* e a subsequente indução de ESPs em protocormo, segmento nodal, ápice foliar, folha, ápice da raiz, entre outros, tem se tornado um método confiável para a propagação de orquídeas (Ng e Saleh 2011). Uma das grandes vantagens de se utilizar folhas e protocormos (Ng e Saleh, 2010) como explantes é justamente a clonagem do material (George et al. 2008). A aplicação de técnicas com a utilização de explantes cultivados *in vitro*, permite a propagação massal da espécie, sem a necessidade de intervenção na população natural.

Para os métodos de multiplicação *in vitro* das orquídeas, as citocininas são os reguladores mais utilizados, muitas vezes combinados com auxinas. Dentre elas, as

mais comuns são o tidiazuron (TDZ) e, principalmente, a 6-benzilaminopurina (BAP). Esta última tem se revelado eficiente no processo de multiplicação, tanto de estruturas aéreas, como na indução de gemas adventícias em diversas espécies (Hu e Wang 1983; Martin e Madassery 2006; Gow et al. 2009; Naing et al 2011). Kuo et al. (2005), utilizando concentrações de BAP entre 2,22 e 13,32 μM , adicionadas em meio de cultura MS/2, obtiveram formação direta de ESPs em até 45% das folhas de *Phalaenopsis* “Little Steve”. De acordo com Mayer et al. (2010), além dos reguladores vegetais, o fotoperíodo influenciou no sucesso de formação de ESPs a partir de ápices de folhas de *Oncidium flexuosum* Sims. Os melhores resultados ocorreram em meio de cultura MS/2, contendo 1,5 μM de TDZ, com 4 protocormóides por explante em fotoperíodo de 16 horas e uma média de 10,8 por explante no escuro.

O objetivo foi testar várias concentrações da citocinina BAP, a influência do fotoperíodo e idade do explante na formação de estruturas semelhantes à protocormos a partir de folhas e protocormos cultivados *in vitro* de *B. peri* e *E. secundum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A polinização manual foi realizada em março de 2010 para *B. peri* no Parque Estadual do Canyon Guartelá (Tibagi, PR) e para a espécie *E. secundum* em maio de 2010 no Instituto Botânico de São Paulo (São Paulo, SP; plantas 17.480 e 17.672). Após 65 a 70 dias da polinização, as cápsulas de *B. peri* estavam maduras e as de *E. secundum* demoraram cerca de 180-190 dias para amadurecer. As cápsulas maduras foram coletadas e levadas ao laboratório de Micropropagação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Para a espécie *B. peri* as sementes foram armazenadas por quatro meses a -20°C , sendo que para *E. secundum* as sementes foram utilizadas sem armazenamento. As sementes foram desinfestadas em solução de 0,75% de

hipoclorito de sódio (NaOCl), acrescido de 0,1% de Tween 20® por dez minutos. Em seguida foram realizadas quatro lavagens com água destilada autoclavada. Posteriormente, as sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo meio WPM ('woody plant medium' – Lloyd e McCown 1980), acrescido de sacarose (3%) e 5,6 g.L⁻¹ ágar Himedia®. As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26±2°C durante o dia e 18±2°C durante a noite, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 40 µmol.m⁻².s⁻¹.

2.2 INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS A PARTIR DE FOLHAS E PROTOCORMOS

2.2.1 *Bulbophyllum peri*

Limbos foliares de plantas de oito meses de cultivo *in vitro* e 0,8 cm de comprimento e limbos de três meses de idade e 0,2 cm de comprimento foram colocados com a face abaxial em contato com o meio de cultura. Da mesma maneira, protocormos de 0,2 cm de diâmetro tendo seu ápice foliar (primeira folha) retirado foram colocados no meio com a área cortada orientada para cima.

Os explantes foram inoculados em meio WPM, suplementado com sacarose (3%), ágar Vetec® (5,6 g L⁻¹) e 2,5; 5; 10 e 20 µM de BAP, além de um controle, sem regulador vegetal.

Todos os tratamentos foram submetidos a 90 dias de fotoperíodo de 16 horas ou 45 dias de escuro seguidos de 45 dias de fotoperíodo de 16 horas em sala de crescimento, com temperatura de 26±2°C durante o dia e 18±2°C durante a noite e luminosidade de 40 µmol.m⁻².s⁻¹.

2.2.2 *Epidendrum secundum*

Limbo foliares de plantas de seis meses de cultivo *in vitro* e 1 cm de comprimento e limbo de dois meses de idade e 0,3 cm de comprimento foram colocados com a face abaxial em contato com o meio de cultura. Os protocormos de dois meses de idade e 0,3 cm de diâmetro tiveram seu ápice foliar retirado e foram colocados no meio com a área cortada orientada para cima.

Os explantes foram inoculados em meio WPM, suplementado com sacarose (3%), ágar Vetec® (5,6 g L⁻¹) e 1; 2,5; 5; 10, 20 e 40 µM de BAP, com um controle sem regulador vegetal.

As culturas de *E. secundum* foram mantidas por 60 dias com fotoperíodo de 16 horas ou 30 dias no escuro, seguido de 30 dias em fotoperíodo de 16 horas, com as mesmas condições de luminosidade e temperatura de *B. peri* (item 2.2.1).

Após a formação de ESPs, aos 90 dias para *B. peri* e 60 dias para *E. secundum*, os mesmos foram individualizados e transferidos para meio de cultura WPM, sem reguladores, para o crescimento das plantas.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com os tratamentos consistindo de cinco placas de Petri contendo dez explantes cada uma. Aos 90 dias para *B. peri* e aos 60 dias para *E. secundum* as seguintes avaliações foram realizadas: porcentagem de oxidação, porcentagem de explantes com formação de ESPs, número médio de ESPs por explante. A análise estatística foi arranjada fatorialmente, considerando-se a idade e o fotoperíodo (2x2); em cada explante separadamente foi avaliado o tratamento e o fotoperíodo para *B. peri* (5x2) e para *E. secundum* (7x2). As médias foram transformadas por raiz quadrada de $x+0,5$ quando necessário (valores apresentados sem transformação), a análise de variância e a comparação de médias pelo Teste de Tukey foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR®.

2.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As folhas e protocormos em várias fases de formação de estruturas semelhantes à protocormos foram fixados em glutaraldeído 25% com tampão fosfato 0,1 M por 24 horas, sendo transferidos para etanol 70%, por meio de série alcoólica. A inclusão em historresina seguiu as instruções do fabricante Leica®. Os cortes com 0,8 µm de espessura foram realizados em micrótomo e corados com azul de toluidina (O'BRIEN *et al.*, 1965). As lâminas coradas foram montadas com água e analisadas em microscópio fotonico.

3. RESULTADOS

3.1 INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS A PARTIR DE FOLHAS E PROTOCORMOS

3.1.1 *Bulbophyllum peri*

A resposta dos diferentes tipos de explante variou significativamente na espécie *B. peri*. Não houve interação entre tipos de explante e o regime de luz utilizado ($p \leq 0,05$). Analisando os resultados, a melhor combinação para promover a indução de ESPs é utilizar protocormos sem o ápice foliar no regime de escuro + luz (tabela 1).

Quando folhas foram utilizadas, a idade, desde a inoculação da semente *in vitro*, influenciou a porcentagem de oxidação. As folhas mais velhas obtiveram 34,6% de oxidação, enquanto que para folhas mais jovens foi de apenas 8,8%, em condições de fotoperíodo de 16 horas, como pode ser visto na tabela 1.

O fotoperíodo influenciou apenas as folhas com oito meses de idade, apresentando maior oxidação no tratamento de 90 dias na presença de luz (fotoperíodo de 16 horas).

Em relação à porcentagem de explantes que regeneraram ESPs e o número médio de ESPs por explante, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos iniciados no escuro e com a utilização de protocormos sem o ápice foliar como explante (tabela 1), atingindo uma média de 85% de explantes responsivos, com 4,3 ESPs por explante. Quanto às folhas, com três ou oito meses, houve baixa formação de ESPs, sendo que a parte responsiva da folha foi apenas a região do corte, na parte basal.

Tabela 1. EFEITO DO EXPLANTE E FOTOPERÍODO NA OXIDAÇÃO, FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS E NUMERO MEDIO DE ESPs POR EXPLANTE RESPONSIVO EM *Bulbophyllum peri* OBTIDOS EM MEIO WPM CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS 90 DIAS.

Explante	Oxidação (%)			Explantes regenerando ESPs (%)			Nº médio de ESPs por explante responsivo		
	Luz ^a	Esc + luz ^a	Média ^b	Luz	Esc + luz	Média	Luz	Esc + luz	Média
folha 3 meses	8,8	9,8	9,3 c	0,8	2,8	1,8 b	0,6	2,8	1,7 b
folha 8 meses	34,6	26,6	30,6 a	0,0	2,8	1,4 b	0,0	1,1	0,6 b
protocormo 3 meses	17,8	13,2	15,5 b	77,0	85,0	81,0 a	1,7	4,3	3,0 a
Média ^b	20,4 A	16,5 B		25,9 B	30,2 A		0,8 B	2,7 A	

^a Luz: 90 dias de fotoperíodo de 16 horas; Esc + luz: 45 dias de escuro, seguidos de 45 dias de fotoperíodo de 16 horas. ^b Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha (em cada variável analisada) não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Analisando-se separadamente os explantes, as folhas com três meses de cultivo de *B. peri* pouco responderam na regeneração de ESPs aos tratamentos realizados. A interação entre os fatores não foi significativa ($p \leq 0,05$). A porcentagem de explantes oxidados não foi influenciada pelo fotoperíodo, no entanto em relação às concentrações de BAP, nas concentrações mais altas (10 e 20 μM) a oxidação foi menor (tabela 2). Houve pouca resposta em relação à porcentagem de regeneração de ESPs. O número médio de ESPs por explante foi influenciado apenas pelo fotoperíodo, sendo as maiores médias observadas no tratamento de escuro + luz. Numericamente, o melhor tratamento foi de 5 μM BAP no regime de escuro + luz (fotoperíodo de 16 horas), com 6% de explantes responsivos e uma média de 5 ESPs por explante (fig 1a), mostrando o efeito da interação de BAP com o regime de luz.

Tabela 2. EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FOLHAS DE TRÊS MESES DE CULTIVO *in vitro* DE *Bulbophyllum peri* CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 90 DIAS

BAP (μ M)	Oxidação (%)			Explantos regenerando ESPs (%) ^b			Nº médio de ESPs por explante responsivo ^b		
	Luz ^a	Esc + luz ^a	Média ^c	Luz	Esc + luz	Média	Luz	Esc + luz	Média
0	18,0	18,0	18 a	2,0	4,0	3,0	0,8	1,8	1,3
2,5	7,0	7,0	7 ab	2,0	4,0	3,0	0,4	1,6	1,0
5	10,0	11,0	11,5 ab	0,0	6,0	3,0	0,0	5,0	2,5
10	4,0	9,0	6,5 b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20	5,0	4,0	4,5 b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Média ^c	8,8 A	9,8 A		0,8	2,8		0,6 B	2,8 A	

^a Luz: 90 dias de fotoperíodo de 16 horas, Esc + luz: 45 dias de escuro, seguidos de 45 dias de fotoperíodo de 16 horas. ^b Variáveis não analisadas estatisticamente devido à presença de resultados zero. ^c Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha (em cada variável analisada) não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Folhas mais velhas de *B. peri*, com oito meses de cultivo *in vitro*, não apresentaram interação entre concentrações de BAP e o fotoperíodo. Analisando-se somente o fotoperíodo, quando os explantes foram colocados inicialmente no escuro, a oxidação foi significativamente menor ($p \leq 0,05$), enquanto a porcentagem de explantes que regeneraram ESPs assim como o número médio por explante foi maior (tabela 3). Em relação às concentrações de BAP, quanto maior a concentração, menor foi a oxidação dos explantes. Não houve nenhuma resposta de regeneração de ESPs nos explantes cultivados no fotoperíodo de 16 horas. Numericamente, o melhor tratamento foi o de 10 μ M de BAP, sendo que 6% dos explantes formaram ESPs em uma média de 2,2 por explante, no regime de escuro, seguido de fotoperíodo de 16 horas (tabela 3).

Tabela 3. EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FOLHAS DE OITO MESES DE CULTIVO *in vitro* DE *Bulbophyllum peri* CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 90 DIAS

BAP	Oxidação			Explantos regenerando ESPs			Nº médio de ESPs por explante responsivo		
	Luz ^a	Esc + luz ^a	Média ^b	Luz	Esc + luz	Média	Luz	Esc + luz	Média
0,0	53,0	44,0	48,5 a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2,5	39,0	28,0	33,5 ab	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5,0	34,0	24,0	29,0 bc	0,0	4,0	2,0	0,0	0,8	0,4
10,0	28,0	23,0	25,5 bc	0,0	6,0	3,0	0,0	2,2	1,1
20,0	19,0	14,0	16,5 c	0,0	4,0	2,0	0,0	0,4	0,2
Média ^b	34,6 A	26,6 B	-	0,0	2,8	-	0,0	1,1	-

^a Luz: 90 dias de fotoperíodo de 16 horas; Esc + luz: 45 dias de escuro, seguidos de 45 dias de fotoperíodo de 16 horas. ^b Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha (em cada variável analisada) não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os melhores resultados para *B. peri* foram obtidos com os protocormos sem o ápice foliar. Não houve interação entre os fatores concentração de BAP e fotoperíodo ($p \leq 0,05$). A ocorrência de oxidação foi semelhante à dos outros explantes, quanto maior a concentração de BAP, menor foi a oxidação dos explantes. Os protocormos cultivados em meio sem BAP (controle) apresentaram oxidação significativamente superior à dos explantes mantidos em meios com as demais concentrações de BAP. O fotoperíodo não influenciou esta variável, porém influenciou a porcentagem de explantes que regeneraram ESPs, sendo melhor nos explantes cultivados no escuro, seguido de luz (fotoperíodo de 16 horas). A resposta de regeneração de ESPs dos explantes cultivados em meio contendo diferentes concentrações de BAP foi significativamente superior a do controle (tabela 4). Quanto ao número médio de ESPs por explante, o fotoperíodo também influenciou a resposta, com o melhor tratamento no escuro, seguido de luz (fotoperíodo de 16 horas). O melhor tratamento foi cultivar os explantes em meio de cultura contendo 20 μ M de BAP, em condições de escuro, seguido de fotoperíodo de 16 horas, no qual a porcentagem de explantes responsivos foi de 94% e média de 5,9 ESPs por explante (fig 1b,1c).

Tabela 4. EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA OXIDAÇÃO E FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTÓCORMOS EM PROTÓCORMOS DE TRÊS MESES DE CULTIVO *in vitro* DE *Bulbophyllum peri* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 90 DIAS.

BAP (μ M)	Oxidação (%)			Explantes regenerando ESPs (%)			Nº médio de ESPs por explante responsivo		
	Luz ^a	Esc + luz ^a	Média	Luz	Esc + luz	Média	Luz	Esc + luz	Média
0	39,0	34,0	36,5 a	59,0	64,0	61,5 b	1,8	3,0	2,4 a
2,5	18,0	8,0	13,0 b	80,0	90,0	85,0 a	1,5	3,3	2,4 a
5	14,0	8,0	11,0 b	71,0	90,0	80,5 a	2,3	4,2	3,3 a
10	8,0	10,0	9,0 b	91,0	90,0	90,5 a	1,3	4,9	3,1 a
20	10,0	6,0	8,0 b	84,0	94,0	89,0 a	1,5	5,9	3,7 a
Média	17,8 A	13,2 A		77,0 B	85,6 A		1,7 B	4,3 A	

^a Luz: 90 dias de fotoperíodo de 16 horas; Escuro: 45 dias de escuro, seguidos de 45 dias de fotoperíodo de 16 horas.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha (em cada variável analisada) não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Após a avaliação aos 90 dias, os ESPs formados e individualizados cresceram normalmente em meio de cultura WPM, sem regulador. Para demonstrar a importância deste processo, foi feita uma estimativa de propagação *in vitro* de *B. peri* (fig 1), utilizando os melhores tratamentos de cada etapa. A primeira etapa é o armazenamento de 1000 sementes a -20C° por quatro meses, seguido de

germinação em meio de cultura WPM sem regulador e com regime de fotoperíodo de 16 horas. Após 90 dias, 56,5% das sementes germinam e 565 plântulas estão no estágio ideal para utilizar a folha e o protocormo sem o ápice foliar. Na etapa seguinte os 565 protocormos são colocados para multiplicar em meio WPM, contendo 20 μM BAP, no escuro por 45 dias e depois mais 45 dias de luz (fotoperíodo de 16 horas), com 94% dos explantes regenerando ESPs, em uma média de 5,9 por explante, totalizando 3.134 novas plântulas *in vitro*. Na mesma época, as 565 folhas são colocadas em meio WPM, com 5 μM BAP também por 45 dias no escuro, seguido de 45 dias na luz (fotoperíodo de 16 horas), sendo que cerca de 6% dos explantes regeneram ESPs em uma média de 5,0 por explante, totalizando 170 novas plântulas *in vitro*. Após 90 dias da inoculação dos explantes, as plântulas formadas são então individualizadas em meio WPM para continuar o crescimento. Desta maneira, decorridos 90 dias da germinação à formação da plântula e mais 90 dias da multiplicação dos explantes, após seis meses podem ser obtidas 3.304 plantas. Considerando-se o protocolo completo, quando as plantas são aclimatizadas, utilizando o substrato Plantmax florestal® e vermiculita (1:2) é possível obter 35% de sobrevivência em casa de vegetação, resultando em 1.156 plantas *ex vitro*.

Estimativa de indução de ESPs

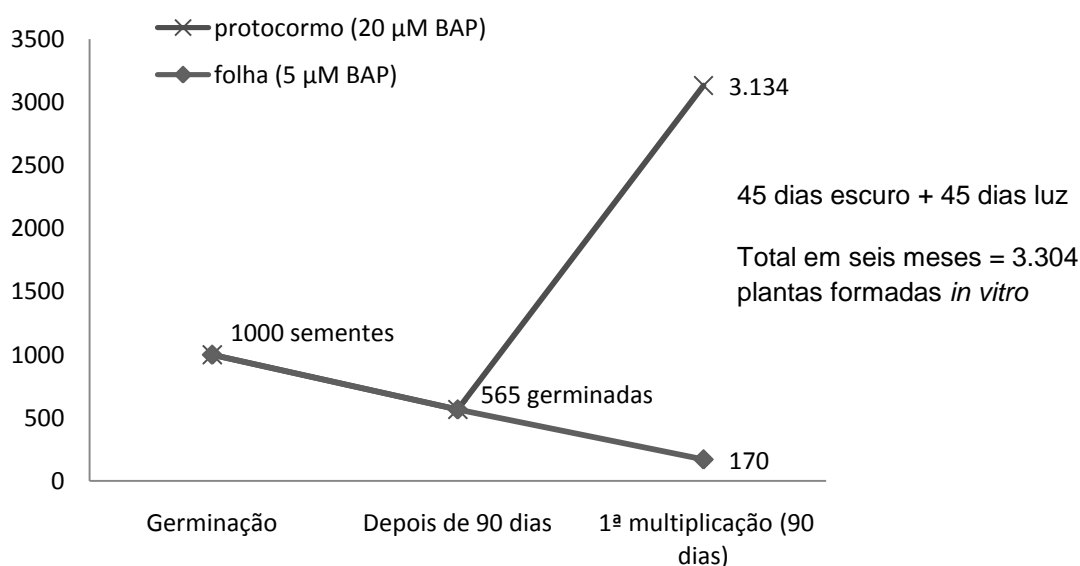


Fig 1. ESTIMATIVA DE PRODUÇÃO DE NOVAS PLANTAS DE *Bulbophyllum peri* A PARTIR DO PROTOCOLO DE GERMINAÇÃO COM 56,5% DE GERMINAÇÃO EM MEIO WPM E PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO, COM 6% DE EXPLANTES FOLIARES RESPONSIVOS (5,0 ESPs POR EXPLANTE) E 94% DOS EXPLANTES DE PROTOCORMOS RESPONSIVOS (5,9 ESPs POR EXPLANTE)

3.1.2 *Epidendrum secundum*

Para essa espécie, os explantes não apresentaram oxidação. Todos os explantes testados induziram a formação de ESPs sendo que os melhores resultados foram obtidos com os protocormos, seguido de folhas mais jovens e mais velhas, como ocorreu para *B. peri*. Não houve interação significativa ($P \leq 0,05$) entre os fatores testados, tipo de explante e fotoperíodo. Na média geral entre todos os tratamentos, os explantes que menos regeneraram ESPs foram folhas mais velhas com seis meses de idade (tabela 5). As folhas com dois meses de idade tiveram mais da metade dos explantes regenerando ESPs, tanto no fotoperíodo de 16 horas quanto no escuro, seguido de luz (fotoperíodo de 16 horas). Praticamente todos os protocormos foram capazes de regenerar ESPs nos dois regimes de luz aos quais foram submetidos. Quanto ao número médio de ESPs por explante, os melhores resultados foram obtidos com os protocormos diferindo significativamente das folhas, independente da idade ($p \leq 0,05$). Os protocormos cultivados no regime de 16 horas de luz apresentaram número médio de ESPs superior ao dos mantidos no escuro, seguido de fotoperíodo de 16 horas (tabela 5).

Tabela 5. EFEITO DO EXPLANTE E FOTOPERÍODO NA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM *Epidendrum secundum*, CULTIVADAS EM MEIO WPM, CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP, APÓS 60 DIAS

Explante	Explantes regenerando ESPs (%)			Nº médio de ESPs por explante responsivo		
	Luz ^a	Escuro + luz ^a	Média	Luz	Escuro + luz	Média
folhas 2 meses	56,8	59,2	58 b	1,7	1,6	1,7 b
folhas 6 meses	26,6	20,4	23,5 c	1,5	1,3	1,4 b
protocormos 2 meses	97,7	96,0	96,9 a	3,8	3,0	3,4 a
Média ^b	60,4 A	58,5 A		2,3 A	2,0 B	

^a Luz: 90 dias de fotoperíodo de 16 horas; Escuro: 45 dias de escuro seguidos de 45 dias de fotoperíodo de 16 horas. ^b Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha (em cada variável analisada) não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As folhas mais jovens de *E. secundum* não apresentaram interação significativa entre os fatores fotoperíodo e concentrações de BAP. O fotoperíodo não influenciou nos resultados, tanto o fotoperíodo de 16 horas e escuro, seguido de luz (fotoperíodo de 16 h) apresentaram médias de porcentagem de explantes que regeneraram ESPs e número médio de ESPs por explante semelhantes. Por outro lado, as concentrações de BAP influenciaram as duas variáveis analisadas. Os explantes cultivados em meio de cultura contendo de 1 a 5 μ M de BAP obtiveram

regeneração de ESPs significativamente superior à do controle ($p \leq 0,05$). Enquanto que para o número médio de ESPs por explante, os melhores resultados foram obtidos com 1, 5 e 10 μM de BAP, sendo significativamente superior ao do controle. O aproveitamento máximo, e mais econômico desse protocolo, para explantes foliares de dois meses de idade de *E. secundum* foi na concentração de 1 μM BAP no regime de escuro, seguido de luz (fotoperíodo de 16 horas), obtendo 70,4% de explantes regenerando 2,0 ESPs por explante (fig 2c).

Folhas mais velhas de *E. secundum* também não apresentaram interação entre os fatores fotoperíodo e BAP. O fotoperíodo não influenciou significativamente nenhuma das variáveis analisadas (tabela 7). Em relação à porcentagem de explantes que regeneraram ESPs, os explantes cultivados em meio com 2,5 μM de BAP apresentaram resultado significativamente superior ao das demais concentrações de BAP e do controle ($p \leq 0,05$). Entretanto, não ocorreu diferença entre os números médios de ESPs do controle e das diferentes concentrações de BAP. No fotoperíodo de 16 horas, a máxima produção foi na concentração de 2,5 μM BAP, com 46% de explantes responsivos e média de 1,8 ESPs por explante (tabela 7).

Tabela 6. EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FOLHAS DE DOIS MESES DE CULTIVO *in vitro* DE *Epidendrum secundum* CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 60 DIAS

BAP (μM)	Explantes regenerando ESPs			Nº médio de ESPs por explante responsivo		
	Luz	Esc + luz	Média ^b	Luz	Esc + luz	Média
0,0	48,8	33,0	40,9 b	1,3	1,0	1,2 c
1,0	69,8	70,4	70,1 a	1,8	2,0	1,9 ab
2,5	62,8	74,0	68,4 a	2,0	1,9	2,0 ab
5,0	61,4	79,0	70,2 a	2,1	1,9	2,0 a
10,0	59,4	44,0	51,7 ab	2,0	2,0	2,0 a
20,0	54,0	68,0	61,0 ab	1,6	1,6	1,6 abc
40,0	41,4	46,0	43,7 ab	1,3	1,0	1,2 bc
Média ^b	56,8 A	59,2 A	-	1,7 A	1,6 A	

^a Luz: 90 dias de fotoperíodo de 16 horas de luz; Escuro: 45 dias de escuro, seguidos de 45 dias de fotoperíodo de 16 horas. ^b Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha (em cada variável analisada) não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 7 . EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FOLHAS DE SEIS MESES DE CULTIVO *in vitro* DE *Epidendrum secundum* , CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 60 DIAS

BAP (μM)	Explantos regenerando ESPs			Nº médio de ESPs por explante responsivo		
	Luz ^a	Esc + luz ^a	Média ^b	Luz	Esc + luz	Média
0,0	20	17	18,5 b	1,8	1,6	1,7 a
1,0	33	21	27,0 b	1,8	1,5	1,7 a
2,5	46	38	42,0 a	1,8	1,6	1,7 a
5,0	25	19	22,0 b	2,3	1,6	2,0 a
10,0	22	14,5	18,3 b	1,2	1,2	1,2 a
20,0	20	14	17,0 b	1,4	1,1	1,3 a
40,0	19,5	12,5	16,0 b	1,3	1	1,2 a
Média ^b	26,5 A	19,4 A		1,7 A	1,4 A	

^a Luz: 90 dias de fotoperíodo de 16 horas; Escuro: 45 dias de escuro, seguidos de 45 dias de fotoperíodo de 16 horas. ^b Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha (em cada variável analisada) não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os melhores explantes para a aplicação do protocolo de *E. secundum* foram os protocormos sem o ápice foliar. A interação entre os fatores testados não foi significativa ($p \leq 0,05$). Tanto na luz (fotoperíodo de 16 horas) quanto no escuro, seguido de luz (fotoperíodo de 16 horas), a porcentagem de regeneração de ESPs foi alta (tabela 8), sendo estatisticamente inferior apenas à da concentração de 40 μM BAP. O número médio de ESPs por explante foi maior com as concentrações de 2,5 e 5 μM . Os tratamentos sem regulador e com concentrações mais altas foram os que apresentaram as menores médias. Devido à resposta na presença de luz, o melhor tratamento e mais econômico foi a concentração de 1 μM BAP, em regime de fotoperíodo de 16 horas, com todos os explantes regenerando ESPs e número médio de 4,4 ESPs por explante (fig 2a, 2b, tabela 8).

TABELA 8 - EFEITO DE BAP E FOTOPERÍODO NA FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM PROTOCORMOS DE DOIS MESES DE CULTIVO *in vitro* DE *Epidendrum secundum* CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA WPM, APÓS 60 DIAS

BAP	Explantos regenerando ESPs (%)			Nº médio de ESPs por explante responsivo		
	Luz ^a	Escuro + luz ^a	Média	Luz	Escuro + luz	Média
0	92,0	98,0	95 a	2,3	2,1	2,2 c
1	100,0	100,0	100 a	4,4	2,9	3,7 b
2,5	100,0	100,0	100 a	4,4	3,5	4,0 ab
5	100,0	100,0	100 a	5,2	4,3	4,8 a
10	100,0	96,0	98 a	3,9	3,1	3,5 b
20	100,0	96,0	98 a	3,4	2,9	3,2 bc
40	92,0	82,0	87 b	3,3	2,5	2,9 bc
Média ^b	97,7 ^{ns}	96 ^{ns}		3,8 A	3,0 B	

^a Luz: 90 dias de fotoperíodo de 16 horas; Escuro: 45 dias de escuro, seguidos de 45 dias de fotoperíodo de 16 horas. ^b Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha (em cada variável analisada) não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,07$).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se estimar a produção de novas plantas de *E. secundum* a partir do protocolo estabelecido (fig 2). Desde a utilização de sementes sem armazenamento para iniciar a germinação *in vitro* em meio de cultura WPM até a obtenção de material vegetal para a multiplicação, são necessários 60 dias para 100% das sementes germinarem e formarem plântulas. Em seguida, os explantes são preparados, retirando-se o ápice foliar do protocormo e cultivados em meio WPM, contendo 1 μ M de BAP, em fotoperíodo de 16 horas por 60 dias, sendo que todos os protocormos regeneram ESPs em uma média de 4,4 por explante. As 1000 folhas que são retiradas dos protocormos são colocadas em meio de cultura WPM também com a mesma concentração de BAP, porém em regime de escuro (30 dias), seguido de luz (fotoperíodo de 16 horas – 30 dias), com cerca de 70,4% dos explantes regenerando ESPs e uma média de 2,0 por explante. Com a regeneração de ESPs podem ser formadas 5808 novas plantas *in vitro*, após 120 dias. Em seguida, os ESPs são individualizados e transferidos para meio WPM sem regulador para continuar o crescimento das plântulas. Para a produção completa de novas plantas, a fase de aclimatização é essencial. Aclimatizando-se esta espécie em substrato Plantmax florestal® e vermiculita (1:2) é possível obter 100% de sobrevivência em casa de vegetação.

Estimativa de indução de ESPs

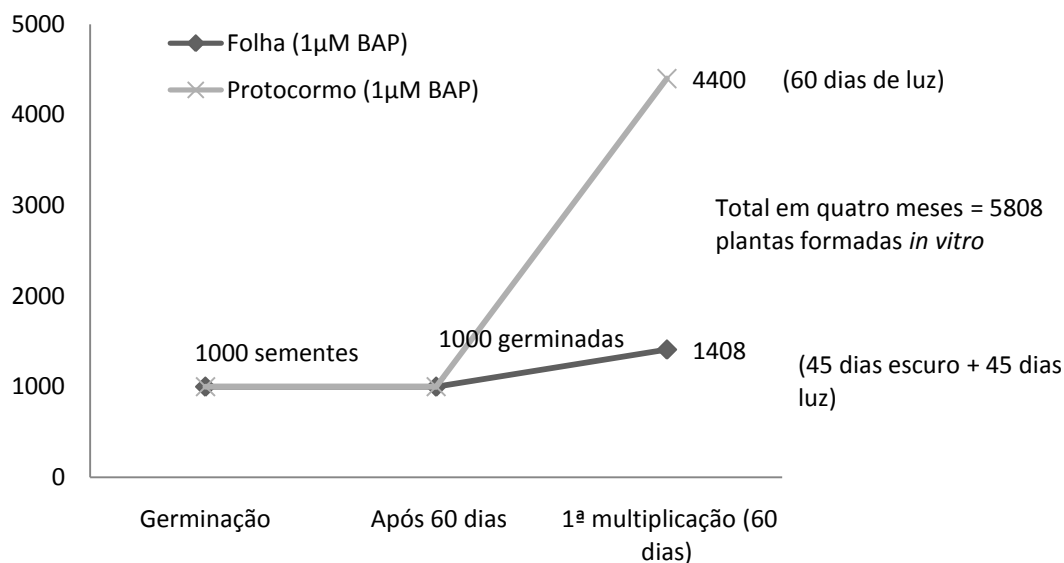


Fig 2 . ESTIMATIVA DE PRODUÇÃO DE NOVAS PLANTAS DE *Epidendrum secundum* A PARTIR DO PROTOCOLO DE GERMINAÇÃO, COM 100% DE GERMINAÇÃO EM MEIO WPM E PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO, COM 70,4% DE EXPLANTES FOLIARES RESPONSIVOS (2,0 ESPs POR EXPLANTE) E 100% DOS EXPLANTES DE PROTOCORMOS RESPONSIVOS (4,4 ESPs POR EXPLNTE)

3.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

3.2.1 *Bulbophyllum peri*

A formação de ESPs ocorreu nas células da epiderme e camadas subepidérmicas de folhas e protocormos (fig 3d, 3e). Foram observadas divisões mitóticas sucessivas nestas células, que iniciaram a formação de ESPs de forma semelhante ao do desenvolvimento de protocormos de *B. peri*. Inicialmente a estrutura é globular, com várias células meristemáticas de citoplasma denso e núcleo grande. Em seguida pode-se observar o ápice foliar se diferenciando, com a formação da folha (fig 3f), sendo que apenas a região basal das folhas respondeu aos tratamentos.

3.2.2 *Epidendrum secundum*

Os cortes de folhas e protocormos de *E. secundum* analisados também induziram a formação de ESPs nas camadas mais externas, a partir de células epidérmicas (4d). Inicialmente formaram estruturas globosas que seguiram o desenvolvimento normal de protocormos desta espécie, logo diferenciando o ápice foliar e formação da primeira folha. Os protocormos sem ápice foliar colocados para induzir a formação de ESPs apresentaram inúmeros centros de células meristemáticas e vasculares por toda a estrutura (fig 4e).

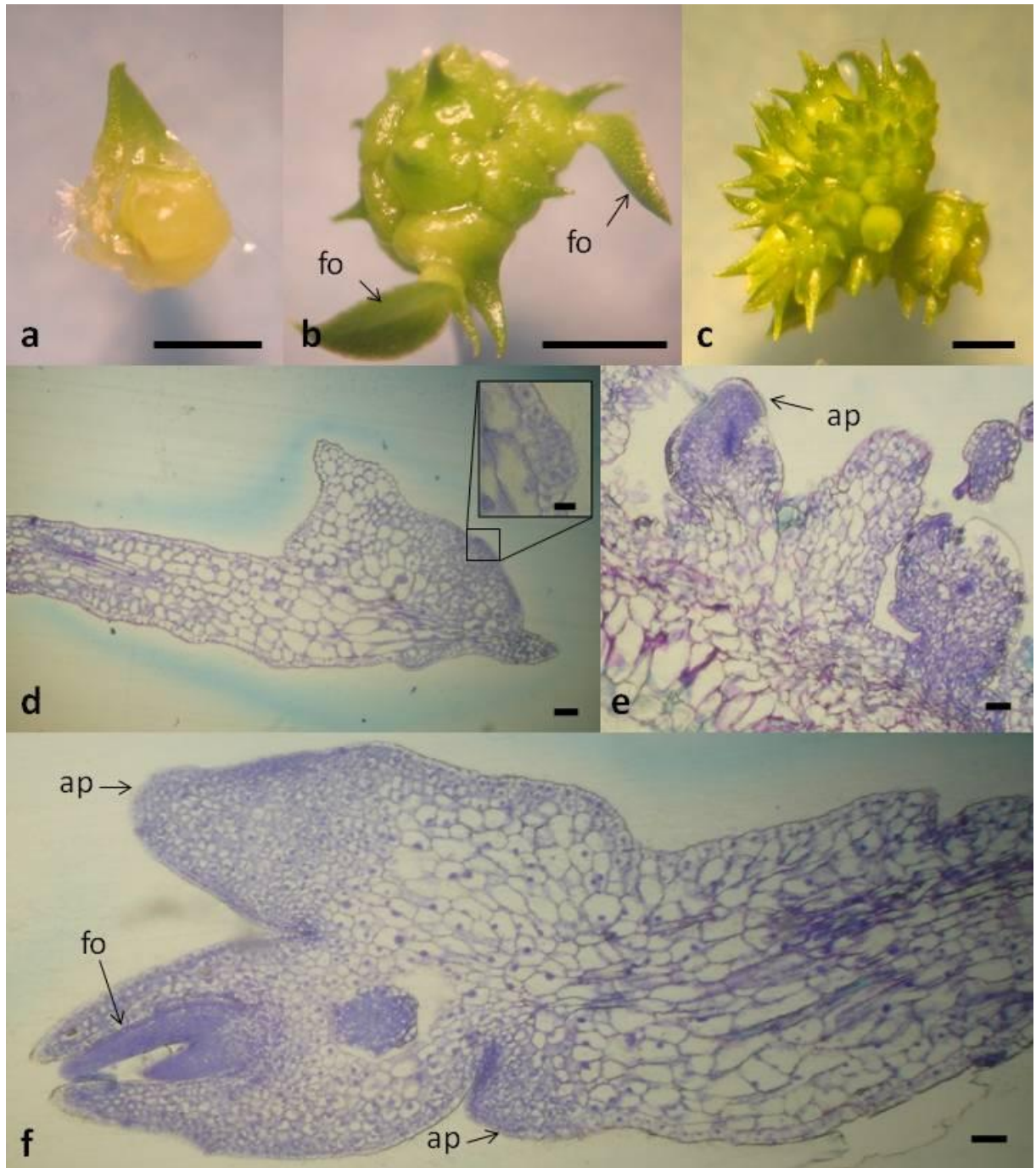


Fig 3 . FORMACAO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) EM FOLHAS E PROTOCORMOS DE *Bulbophyllum peri*: a – FOLHA APRESENTANDO UMA MASSA CELULAR NA REGIÃO BASAL EM MEIO WPM COM 5 μ M BAP; b, c – PROTOCORMO APRESENTANDO VÁRIOS ESPs COM A PRIMEIRA FOLHA DESENVOLVIDA (fo) EM MEIO WPM COM 20 μ M BAP; d – DIVISÕES CELULARES DA EPIDERME DA FOLHA; e – ESPs COM O ÁPICE FOLIAR (ap) SE FORMANDO A PARTIR DE PROTOCORMOS; f – ESPs FORMADOS A PARTIR DE FOLHA EM VÁRIOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO. BARRA: a, b, c – 1 mm; d, e, f – 0,1mm

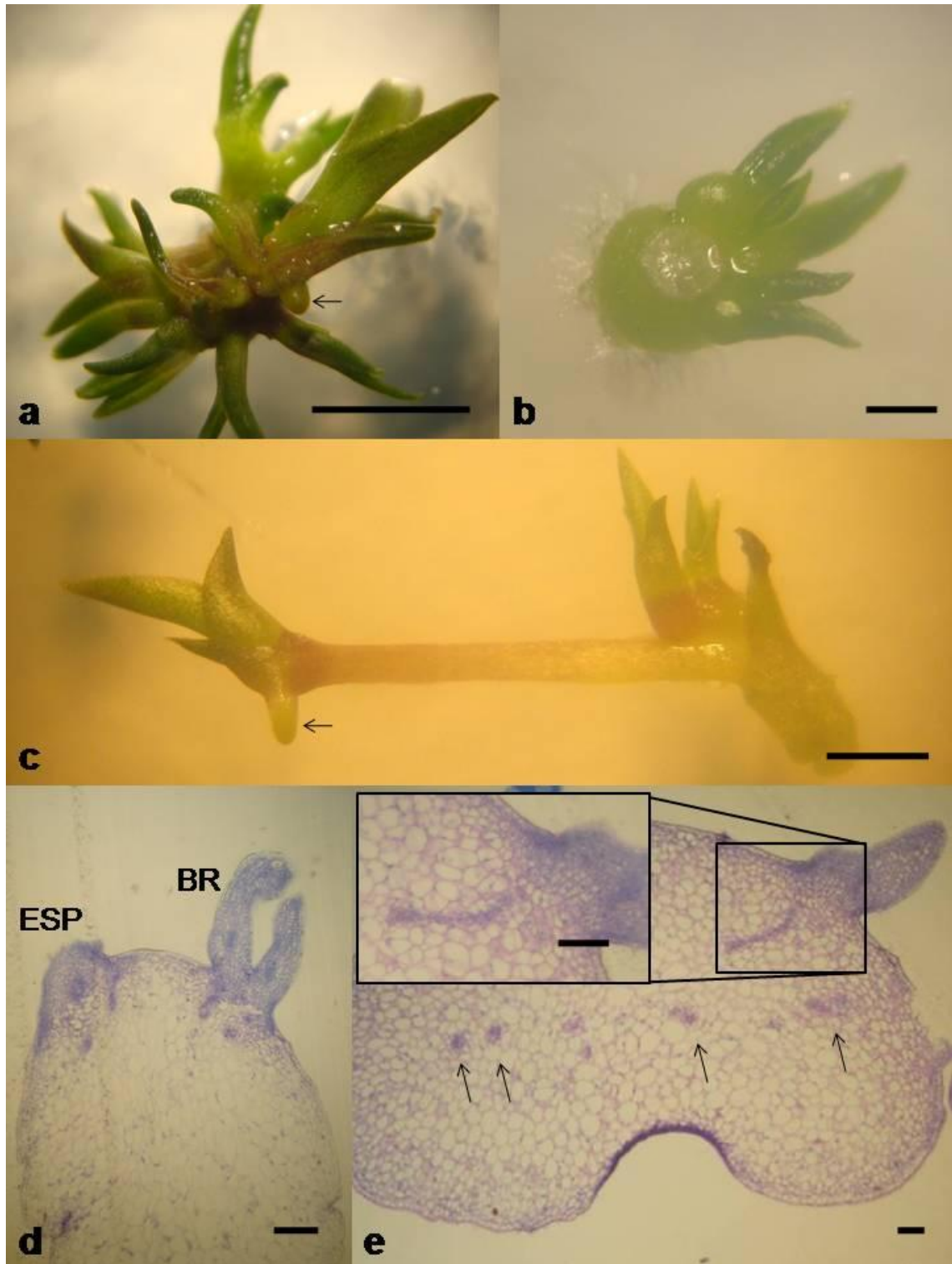


Fig 4 . FORMACAO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) EM FOLHAS E PROTOCORMOS DE *Epidendrum secundum*: **a** – ESPs FORMADOS A PARTIR DE PROTOCORMO APÓS 60 DIAS EM MEIO WPM COM BAP, INICIANDO O ENRAIZAMENTO (FLECHA); **b** - ESPs FORMADOS A PARTIR DE PROTOCORMO APÓS 30 DIAS EM MEIO WPM COM BAP; **c** - ESPs FORMADOS A PARTIR DE FOLHA APÓS 60 DIAS EM MEIO WPM COM BAP, INICIANDO O ENRAIZAMENTO (FLECHA); **d** – INDUÇÃO DIRETA DE ESTRUTURA SEMELHANTE À PROTOCORMO (ESP) E BROTAÇÃO (BR) EM PROTOCORMO; **e** – PROTOCORMO COM FORMAÇÃO DE ESP E PONTOS DE PROCÂMBIO (FLECHAS). BARRA: **a** – 1 cm; **b**, **c** – 1 mm; **d** – 0,2 mm; **e** – 0,1 mm

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, os explantes com melhores resultados foram os protocormos sem o ápice foliar, para ambas as espécies estudadas. Da mesma maneira, Naing *et al.* (2010) obtiveram bons resultados na regeneração de ESPs a partir de protocormos cortados de *Coelogyne cristata*, inoculados em meio MS, com baixas concentrações de BAP, sendo 0,22 μM a melhor. Resultados semelhantes também foram obtidos para um híbrido de *Cymbidium*, em que o melhor explante para a regeneração de ESPs também foi o protocormo sem a região apical, quando comparado com protocormo cortado ao meio e thin cell layer” longitudinal e transversal (Tanaka e Silva 2006).

Os protocormos são resultantes da germinação das orquídeas, e são compostos por células parenquimáticas revestidas por epiderme. Como observado na anatomia do crescimento da plântula de *Epidendrum secundum* e por outros autores, a estrutura do protocormo é meristemática, especialmente o pólo superior do protocormo que dá origem ao ápice foliar (Kraus et al. 2006; Cribb 1999). As partes meristemáticas são notadamente ricas em auxinas (Taiz e Zeiger 2004). Pelo fato de serem constituídos de células de alta atividade metabólica e com a retirada do ápice foliar ocorreu a quebra de dominância apical, que aliado a adição de citocinina no meio de cultura promoveu a regeneração de ESPs. Isto explica os resultados encontrados para *Bulbophyllum peri* e *Epidendrum secundum* indicando que protocormos foram os explantes mais responsivos para induzir a regeneração de ESPs.

Folhas de *B. peri* de três ou oito meses de idade pouco responderam aos tratamentos realizados com adição de BAP. Já para a espécie *E. secundum* as folhas mais novas tiveram quase o dobro de explantes regenerando ESPs. Resultados semelhantes foram obtidos por Martin e Madassery (2006) que verificaram que as concentrações de BAP de até 31,1 μM foram ineficazes para induzir a formação de ESPs e brotações em folhas de *Dendrobium* cultivares Sonia 17 e 28, como também ocorreu com a espécie *B. peri* até a concentração mais alta testada, de 20 μM de BAP. No entanto, para *Phalaenopsis* “Little Steve”, Kuo, Chen e Chang (2005) demonstraram que a adição de BAP em meio MS/2 foi efetiva na indução de ESPs em várias partes da folha cultivada *in vitro*, por exemplo, com a

concentração de 13,32 μM de BAP, com 15% dos explantes formando ESPs na região do corte e 15% ao longo de toda a superfície foliar. No estudo de Gow et al. (2009) as folhas mais jovens de plantas cultivadas *in vitro* de *Phalaenopsis amabilis* tiveram 25% dos explantes formando ESPs e média de 3,4 por explante em meio MS/2 com 13,3 μM de BAP, após 60 dias de indução. Estes estudos corroboram com os resultados obtidos para *E. secundum*, nos quais houve formação de ESPs nas folhas utilizadas como explante. No entanto, a regeneração de ESPs de *E. secundum* foi superior aos resultados obtidos com as espécies citadas, sendo que com apenas 1 μM BAP foi obtido 70,4% de regeneração.

Os resultados indicaram que as folhas mais jovens de *E. secundum* foram mais responsivas na regeneração de ESPs do que as folhas mais velhas. De acordo com Chugh et al. (2009) diversos trabalhos mostraram esta mesma variação na competência de regeneração, que é a frequência de resposta e o número de regenerantes, em explantes foliares. A diferença nas respostas de explantes mais jovens e mais maduros sob condições idênticas demonstra a importância da planta mãe e da idade fisiológica do explante (Murthy e Pyati 2001).

Todos estes resultados positivos ou negativos, utilizando baixas ou altas concentrações de regulador e diferentes explantes, comprovam que a necessidade por reguladores exógenos no meio de cultura é espécie específica. Além disso, um regulador pode ser melhor que outro para determinada espécie. Assim, nenhum resultado obtido pode ser generalizado, como concluído também por Ng e Saleh (2010) e Yan et al. (2006) para outras espécies de orquídeas.

O regime de luz teve grande influência para os protocolos que foram os explantes mais responsivos da espécie *B. peri*, sendo um pouco menos expressivo nos resultados obtidos para *E. secundum*. O importante a ser notado é o fato de que para a primeira espécie o tratamento iniciado no escuro foi melhor, e para a segunda espécie o tratamento ideal foi de fotoperíodo de 16 horas durante todo o cultivo. Da mesma maneira, em experimentos semelhantes testando o efeito da presença ou ausência de luz, Mayer et al. (2010) observaram que o efeito da luz na regeneração direta de ESPs foi determinante. Na presença de luz constante a taxa de regeneração foi muito baixa e o número médio de ESPs foi menor quando comparado com o dos explantes tratados apenas no escuro. Resultados semelhantes também foram encontrados por Gow et al. (2009), em que o regime de luz em folhas de *Phalaenopsis amabilis* e *P. "Nebula"* influenciou na resposta dos

explantes. Em ausência de luz houve maior porcentagem de explantes responsivos, o mesmo comportamento dos explantes de *B. peri*.

Estas diferenças nas respostas relacionadas com a presença ou ausência de luz indicaram que existem diferenças nos processos fisiológicos de cada espécie para a formação de ESPs. Apesar da importância da luz para o crescimento normal de brotações verdes e plântulas, o estabelecimento de culturas no escuro pode aumentar as chances de sucesso das mesmas, como foi demonstrado pelos resultados de indução de ESPs em *B. peri*. Isto porque na ausência de luz, geralmente, há um menor escurecimento dos tecidos vegetais e a quantidade de substâncias inibitórias de crescimento, produzidas pelo próprio explante, é reduzida (George et al. 2008). Porém, para *E. secundum*, a presença ou ausência de luz parece pouco influenciar na indução de ESPs nas primeiras semanas de crescimento dos explantes.

Para fins de conservação, a variabilidade genética existente nas sementes e a segurança de menor variação somaclonal com a formação direta de ESPs, tornam estes protocolos ideais para a rápida produção de plantas de *Bulbophyllum peri* e *Epidendrum secundum*, representantes de dois dos maiores gêneros da família Orchidaceae.

5. CONCLUSÃO

Os protocolos estabelecidos indicaram que os protocormos são os melhores explantes para promover uma rápida e eficiente indução de ESPs, seguidos de folhas jovens e folhas mais velhas. Para a espécie *B. peri*, a adição de BAP ao meio de cultura WPM na concentração de 20 μ M para protocormos e 5 μ M para as folhas jovens promovem as mais altas porcentagens de regeneração. Para *E. secundum* a concentração ideal de BAP é de 1 μ M tanto para protocormos quanto para as folhas mais jovens.

As análises histológicas demonstraram que para ambos os tipos de explantes, folhas e protocormos, a regeneração dos ESPs foi direta e ocorreu a partir de sucessivas divisões das células epidérmicas.

6. REFERÊNCIAS

- Cribb PJ (1999) Morphology. In: Pridgeon AM, Cribb PJ e Chase MW (eds.). Genera Orchidacearum: general introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Oxford University Press, Oxford, v.1, pp. 13-23
- Chugh S, Guha S, Rao IU (2009). Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae, 122: 507-520
- Díaz M, Del SS, Álvarez CC (2009) Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid. In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, v. 45
- Dressler R (1981) The orchids: natural history an classification. Harvard Cambridge: University Press
- Dressler RL (1993) Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland, OR.
- George EF, Hall MA, Klerk GD (2008) Plant propagation by tissue culture. v.1. The Background, 3ed. Springer, 501p.
- Gow WP, Chen JT, Chang WC (2009). Effects of genotype, light regime, explants position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants of Phalaenopsis orchids. Acta Physiol. Plant, 31: 363-369.
- Hu CY, Wang PJ (1983) Meristem, shoot tip and bud culture. In: Evans DA, Sharp WR Handbook of plant cell cultures. New York: Macmillan, v.1, p.177-227.
- Kraus JE, Kerbauy GB, Monteiro WR (2006) Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb.f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. Hoehnea 33: 177-184
- Kuo HL, Chen JT, Chang WC (2005). Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of Phalaenopsis Little Steve. Vitro Cell Dev. Biol. Plant, 41: 453-456
- Lloyd G, Mccown B (1980) Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. HortScience, Alexandria, v. 15, p. 416
- Martin KP, Madassery J (2006) Rapid in vitro propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. Sci. Hort. 108:95–99.
- Mayer JLS, Stancato GC, Appezzato-da-Glória B (2010) Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). Plant Cell Tiss Organ Cult, v. 103

- Murthy HN, Pyati AN (2001) Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant., 37: 223-226.
- Naing AH, Chung JD, Park IN, Lim KB (2010). Efficient plant regeneration of the endangered medicinal orchid, *Coelogyne cristata* using protocorm-like bodies. Acta Physiol Plant 33:659-666
- Ng CY, Saleh NM (2011) In vitro propagation of Paphiopedilum orchid through formation of protocorm-like bodies. Plant Cell, Tiss Organ Cult 105:193-202
- O'Brien, T. P.; Feder, N. & McCully, M. E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59: 368-373
- Rasmussen FN (1985) Orchids. Pp. 249-274. In: R.M.T. Dahlgren; H.T. Clifford & P.F. Yeo (eds.). The families of the Monocotyledons. Berlin, Springer-Verlag
- Stancik JF, Goldenberg R, Barros F de (2009) O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. Acta bot. bras. 23(3): 864-880
- Taiz L, Zeiger E (2004) Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, p.449-484
- Silva JAT, Tanaka M (2006). Multiple regeneration pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). J Plant Growth Reg 25:203-210.
- Yan N, Hu H, Huang JL, Xu K, Wang H, Zhou ZK (2006) Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings derived from mature seeds. Plant Cell Tissue Org Cult 84:113–117

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A germinação *in vitro* da espécie *Epidendrum secundum* é uma prática viável, demonstrada pelos ótimos resultados encontrados, especialmente no meio WPM, sem a necessidade de adicionar BAP. Banco de sementes é uma boa alternativa, sendo que até doze meses de armazenamento a -20°C houve pouca perda da viabilidade no melhor meio de cultura. A metodologia de aclimatização foi ideal para esta espécie, pois 100% das plantas sobreviveram nesta etapa.

Para *Bulbophyllum peri* foi descoberta a presença de dormência fisiológica nas sementes, fato este que dificultou a germinação *in vitro*. Sementes sem armazenamento precisaram de tratamento de pré-resfriamento para aumentar a porcentagem de germinação. Banco de sementes parece ser viável para esta espécie, sendo que a melhor porcentagem de germinação foi encontrada após quatro meses de armazenamento e não diminuiu após oito e doze meses no meio WPM. No entanto, são necessários mais estudos para que a dormência fisiológica encontrada nas sementes seja superada de maneira eficaz, podendo atingir o potencial máximo de germinação *in vitro*. A etapa de aclimatização foi difícil para as plantas de *B. peri*, indicando que a metodologia deve ser melhorada para esta espécie.

Os cálculos de índice de crescimento e índice de velocidade de germinação devem sempre acompanhar as avaliações de viabilidade em bancos de semente, pois como foram observados os resultados indicados por estes índices antecedem a perda da viabilidade e vigor das sementes. Alternativas para manter estes índices estáveis durante o armazenamento devem ser pesquisadas para aumentar a vida útil das sementes armazenadas.

A multiplicação de ambas as espécies foi eficiente, indicando que a adição de concentrações mais altas de BAP (5 e 20 μM) foi melhor para as folhas jovens e protocormos sem o ápice foliar de *B. peri* no regime de escuro, seguido de luz (fotoperíodo de 16 horas), e uma concentração mais baixa de BAP (1 μM) foi ideal para os mesmos explantes de *E. secundum*, independente do regime de luz. O explante mais responsivo nesta etapa foi o protocormo, devido à sua natureza meristemática.

Com o processo de *E. secundum*, grande número de plântulas são produzidas em curto espaço de tempo, ou seja, a premissa da micropropagação foi cumprida. Entretanto, o processo de *B. peri* necessita ser melhorado. A partir deste estudo realizado foi possível estabelecer estratégias de conservação *ex situ* e *in vitro* para as espécies *Epidendrum secundum* Jacq. e *Bulbophyllum peri* Schltr., sendo necessários mais estudos para que o aproveitamento das técnicas seja o máximo possível.

ANEXO 1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA GERMINAÇÃO DE *E. secundum*, EM mg L⁻¹

Componentes	MS (1962)	MS/2	Woody Plant Medium	Knudson (Arditti, 1982)
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	500
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	370	250
K ₂ SO ₄	-	-	990	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220	96	-
KNO ₃	1900	950	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556	1000
NH ₄ NO ₃	1650	825	400	-
KH ₂ PO ₄	170	85	170	250
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,3	13,9	27,8	25
Na ₂ EDTA	37,3	18,65	33,6	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	11,15	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	22,3	7.5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,3	8,6	0,331
MoO ₃	-	-	-	0,016
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,012	0,25	0,0624
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,012	-	-
KI	0,83	0,41	-	-
H ₃ BO ₃	6,2	3,1	6,2	0,056
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,12	0,25	-
Mio-inositol	100	100	100	-
Ácido Nicotínico	0,5	0,5	0,5	-
Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,5	-
Tiamina HCl	0,1	0,1	1	-
Glicina	2	2	2	-
Sacarose	30000	30000	30000	30000
Ágar	5600	5600	5600	5600

ANEXO 2. COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MACRONUTRIENTES NOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO

Meio de cultura	Macronutriente (mM)								
	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	NH ⁴⁺	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	H ₂ PO ₄	Cl ⁻
WPM	12,6	0,2	2,4	1,5	4,9	9,6	7,5	1,3	0,1
MS	20,0	0,2	3,0	1,5	20,0	39,4	1,6	1,3	6,0
MS/2	10,0	0,1	1,5	0,8	10,0	19,7	0,8	0,7	3,0
KC	1,8	-	4,2	1,0	7,6	8,4	4,8	1,8	-

ANEXO 3. COMPOSIÇÃO DOS MICRONUTRIENTES NOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA GERMINAÇÃO

Meio de cultura	Micronutriente (µM)							
	Fe	B	Mn	Zn	I	Cu	Co	Mo
WPM	100,00	100,00	130,00	30,00	-	1,00	-	1,10
MS	100,00	100,00	100,00	30,00	5,00	0,10	0,10	1,00
MS/2	50,00	50,00	50,00	15,00	2,50	0,05	0,05	0,50
KC	90,00	0,90	44,40	1,15	-	0,25	-	0,11

ANEXO 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A GERMINAÇÃO DE *E. secundum* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO A -20°C, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio
Meio	3	1242,14*
Armazenamento	3	7424,26*
Meio x Armazenamento	9	209,98*
Erro experimental	64	13,94
Total	79	
Coeficiente de variação (%)		4,72

*Significativo a 0,05 de probabilidade

ANEXO 5 . ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A GERMINAÇÃO DE SEMENTES SEM ARMAZENAMENTO DE *E. secundum* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO REGULADOR BAP, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio
Regulador	3	575,87*
Erro experimental	16	20,74
Total	19	
Coeficiente de variação (%)		5,37

*Significativo a 0,05 de probabilidade

ANEXO 6. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *E. secundum* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO A -20°C EM CADA PERÍODO DE CULTIVO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio
Meio	3	20,48*
Armazenamento	3	214,59*
Meio x Armazenamento	9	1,18*
Erro experimental	64	0,13
Total	79	
Coeficiente de variação (%)		4,92

*Significativo a 0,05 de probabilidade

ANEXO 7. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ÍNDICE DE CRESCIMENTO DE *E. secundum* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO A -20°C EM CADA PERÍODO DE CULTIVO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio
Meio	3	1,25*
Armazenamento	15	53,85*
Meio x Armazenamento	45	0,07*
Erro experimental	256	0,01
Total	319	
Coeficiente de variação (%)		2,58

*Significativo a 0,05 de probabilidade

ANEXO 8. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO PARA A PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA, MASSA FRESCA, NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES, NÚMERO MÉDIO DE FOLHAS E ALTURA (cm) EM DIFERENTES SUBSTRATOS AVALIADOS NO MOMENTO DO TRANSPLANTIO E APÓS 90 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio				
		Sobrevivência	Massa fresca	Nº médio de raízes	Nº médio de folhas	Altura
Substrato	2	34,52 ^{ns}	0,05 ^{ns}	5,21*	3,29*	0,28 ^{ns}
Avaliação	1	105,02*	1,99*	3,97 ^{ns}	6,60*	32,57*
Substrato x Avaliação	2	34,52 ^{ns}	0,05 ^{ns}	1,80 ^{ns}	3,29*	0,25 ^{ns}
Erro experimental	42	21,83	0,02	1,15	0,64	0,14
Total	47					
Coeficiente de variação (%)		4,74	34,87	18,87	17,30	16,73

*Significativo a 0,05 de probabilidade

^{ns} Não significativo

ANEXO 9. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE *B. peri* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO A -20°C, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	
		Germinação	IVG
Meio	3	5825,80*	32,89*
Armazenamento	3	3208,46*	8,32*
Meio x Armazenamento	9	326,40*	1,44*
Erro experimental	64	32,64	0,14
Total	79		
Coeficiente de variação (%)		20,29	22,14

*Significativo a 0,05 de probabilidade

ANEXO 10. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA ÍNDICE DE CRESCIMENTO DE *B. peri* EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO A -20°C EM CADA PERÍODO DE CULTIVO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio
Meio	3	2,18*
Armazenamento	11	2,72*
Meio x Armazenamento	32	0,29*
Erro experimental	192	0,01
Total	239	
Coeficiente de variação (%)		5,39

*Significativo a 0,05 de probabilidade

ANEXO 11. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A GERMINAÇÃO E ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *B. peri* EM SEMENTES SEM ARMAZENAMENTO COM E SEM PRÉ-RESFRIAMENTO EM FUNÇÃO DO MEIO DE CULTURA E TEMPERATURA, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	
		Germinação	IVG
Temperatura	1	3591,03*	7,54*
Meio	3	987,16*	2,29*
Temperatura x Meio	3	512,16*	1,12*
Erro experimental	32	7,75	0,01
Total	39		
Coeficiente de variação (%)		21,37	18,80

*Significativo a 0,05 de probabilidade

ANEXO 12. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS DE *B. peri* NA ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio
Substrato	2	1635,14*
Erro experimental	12	62,50
Total	14	
Coeficiente de variação (%)		55,80

*Significativo a 0,05 de probabilidade

ANEXO 13. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS TIPOS DE EXPLANTES UTILIZADOS PARA A INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FUNÇÃO DO FOTOPERÍODO EM *B. peri*

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio
Explante	2	6001,17*
Fotoperíodo	1	560,67 ^{ns}
Explante x Fotoperíodo	2	258,17 ^{ns}
Erro experimental	144	190,75
Total	149	
Coeficiente de variação (%)		74,79

*Significativo a 0,05 de probabilidade

^{ns} Não significativo

ANEXO 14. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA FOLHAS JOVENS, FOLHAS MAIS VELHAS E PROTOCORMOS UTILIZADOS PARA INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM *B. peri* EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP E FOTOPERÍODO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio		
		Folhas 3 meses	Folhas 8 meses	Protocormos 3 meses
Fotoperíodo	1	12,50 ^{ns}	8,00*	264,50 ^{ns}
BAP	4	283,25*	13,90*	1415,00*
Fotoperíodo x BAP	4	13,75 ^{ns}	0,20 ^{ns}	47,00 ^{ns}
Erro experimental	40	78,75	1,27	163,75
Total	49			
Coeficiente de variação (%)		95,42	36,86	82,56

*Significativo a 0,05 de probabilidade

^{ns} Não significativo

ANEXO 15. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS TIPOS DE EXPLANTES UTILIZADOS PARA A INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM FUNÇÃO DO FOTOPERÍODO EM *E. secundum*

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio
Explante	2	95692,36*
Fotoperíodo	1	241,07 ^{ns}
Explante x Fotoperíodo	2	398,44 ^{ns}
Erro experimental	204	251,14
Total	209	
Coeficiente de variação (%)		26,74

*Significativo a 0,05 de probabilidade

^{ns} Não significativo

ANEXO 16. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA FOLHAS JOVENS, FOLHAS MAIS VELHAS E PROTOCORMOS UTILIZADOS PARA INDUÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS EM *E. secundum* EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP E FOTOPERÍODO

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio		
		Folhas 2 meses	Folhas 6 meses	Protocormos 2 meses
Fotoperíodo	1	100,80 ^{ns}	885,73*	51,42 ^{ns}
BAP	6	1581,67*	848,39*	221,43*
Fotoperíodo x BAP	6	458,00 ^{ns}	17,89 ^{ns}	61,43 ^{ns}
Erro experimental	56	370,91	174,43	27,86
Total	69			
Coeficiente de variação (%)		33,21	57,57	5,45

*Significativo a 0,05 de probabilidade

^{ns} Não significativo

ANEXO 17. INSTRUCTIONS FOR AUTHORS SUBMITTING TO PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE:

Title Page

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

- Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- [Word template \(zip, 154 kB\)](#)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php